

ПОЧТОВЫЙ АДРЕС:

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

Редакция журнала
«Патологическая физиология
и экспериментальная терапия».
Home page: www.jpvet.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 диссертаци-
он на соискание ученой степени докто-
ра и кандидата наук.

ИФРИНЦ 0,600

Журнал включен в базу данных Scopus

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

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

Сдано в набор 20.09.2015 г.
Подписано в печать 11.11.2015 г.

ISSN 0031-2991
Пат. физиол. и Экспер. тер.
2015. Том 59. №3. 1–158.

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», 2015.

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

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

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

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

Том 59, № 3, 2015
Июль—сентябрь

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор Б.Б. Мороз

Ю.В. Архипенко, Е.И. Асташкин, С.В. Грачев,
Н.С. Гурко (ответственный секретарь), Т.А. Гуськова,
И.С. Гушин (зам. главного редактора), А.В. Ефремов,
В.Б. Кошелев, Н.А. Крупина, А.А. Кубатиев,
П.Ф. Литвицкий, В.В. Новицкий,
Ю.А. Петрович, Г.В. Порядин,
В.К. Решетняк (зам. главного редактора),
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 0,600

ISSN 0031-2991
Pathological
physiology
and experimental
therapy
2015. Vol. 59. №3. 1–158.

Moscow

© ООО «Гениус Медиа», 2015.

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, № 3, 2015

July—September

Editor in chief B.B. Moroz

Assistant editors in chief:

I.S. Gushchin, V.K. Reshetnyak

Executive editor, scientific editor: N.S. Gourko

Members of editorial board:

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

- Титов В.Н., Осипов Г.А., Тарарак Э.М., Годков М.А.** Жирные кислоты ткани сонных артерий в области атером и липидных пятен. Единение патогенеза синдрома атеросклероза и его симптома — атероматоза интимы артерий 4
- Панченко Л.Ф., Теребилина Н.Н., Пирожков С.В., Наумова Т.А., Баронец В.Ю., Балашова А.А., Гармаш И.В.** Сывороточные маркеры фиброза и эндотелиальной дисфункции у больных алкоголизмом с различной степенью фиброза печени 18
- Шакова Ф.М., Калинина Т.И., Барсков И.В., Стельмашук Е.В., Генрихс Е.Е., Юрин В.Л., Романова Г.А.** Сравнение нейропротективных эффектов производных эритропоэтина при разных способах введения на модели двустороннего фокального ишемического повреждения префронтальной коры мозга крысы 28
- Куликов В.П., Трегуб П.П., Ковзелев П.Д., Дорохов Е.А., Белоусов А.А.** Гиперкапния — альтернативный гипоксии сигнальный стимул для повышения HIF-1 α и эритропоэтина в головном мозге 34
- Ветрилэ Л.А., Фомина В.Г., Невидимова Т.И., Ветлугина Т.П., Батухтина Е.И., Савочкина Д.Н., Захарова И.А., Давыдова Т.В.** Аутоантитела к глутамату и ГАМК при опиоидной наркомании 38
- Бохан Н.А., Невидимова Т.И.** Взаимосвязь уровня половых гормонов, реакции на феромоны и продукции интерлейкинов с риском формирования наркотической зависимости 44
- Юматов Е.А., Перцов С.С., Дудник Е.Н., Крамм М.Н., Стрелков Н.О.** Контроль физиологических функций человека во время повседневного ночного сна 47
- Аниховская И.А., Кубатиев А.А., Салахов И.М., Теблов К.И., Яковлев М.Ю.** Динамика концентрации эндотоксина в сыворотке крови у больных с острым неосложнённым Q-инфарктом миокарда 55
- Левин Г.Я., Сухарева Е.Г. Влияние эритроцитарных микровезикул на агрегацию тромбоцитов при ожоговой болезни 62
- Коненков В.И., Бородин Ю.И., Макарова О.П., Бгатова Н.П., Рачковская Л.Н.** Влияние наноразмерных частиц карбоната лития на образование оксида азота и активность аргиназы в опухоли и перитонеальных макрофагах при развитии гепатокарциномы 29 69
- Алиева Т.Р., Аллаhverдиева Л.И.** Сравнительная характеристика уровня гистамина и иммуноглобулинов класса Е и G в крови и лимфе при экспериментальных анафилактическом шоке и феномене Артюса 76
- Отман И.Н., Зозуля С.А., Сарманова З.В., Ключник Т.П.** Воспалительные и аутоиммунные реакции при различных формах нарушения функционирования нервной системы 81
- Чаусова С.В., Гуревич К.Г., Бондарева Г.П., Филатов О.Ю., Малышев И.Ю.** Роль клеточных медиаторов в развитии феномена ингибирования стимулированной сульфатом бария люминол-зависимой хемилюминесценции крови под влиянием нестероидных противовоспалительных препаратов у пациентов с непереносимостью данных препаратов 89
- Волков Е.Е., Решетняк В.К., Домарацкая Е.И., Волков А.Е., Кучеряну В.Г., Буторина Н.Н., Паюшина О.В.** Влияние низкочастотной электростимуляции на регенерацию костной ткани 94
- Никифоров Н.Г., Makeev В.Ю., Елизова Н.В., Орехов А.Н.** Активируемость моноцитов человека при атеросклерозе 100

ОБЗОРЫ

- Зорин В.Л., Зорина А.И., Пулин А.А., Копнин П.Б., Еремин И.И.** Перспективы использования стволовых клеток, обладающих миогенным потенциалом, в лечении заболеваний скелетных мышц: обзор исследований. Ч. 2. Популяции стволовых клеток мышечного и немuscleного происхождения 106
- Малышев И.Ю.** Эпигенетические, посттранскрипционные и метаболические механизмы репрограммирования макрофагов 118
- Никифоров Н.Г., Елизова Н.В., Никитина Н.А., Карагодин В.П., Орехов А.Н.** Активация макрофагов при атеросклерозе. Сообщение 1: активация макрофагов в норме и в атеросклеротическом поражении 128
- Алексеева Е.В., Полова Т.С., Сальников П.С.** Глутаматергическая нейромедиаторная система в регуляции моторной активности желудочно-кишечного тракта 132

ХРОНИКА

- Пигаревский П.В., Чирский В.С., Аничков Н.М.** К 130-летию со дня рождения крупного патолога академика АН и АМН СССР Николая Николаевича Аничкова 150

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- Titov V.N., Osipov G.A., Tararak E.M., Godkov M.A.** Fatty acid composition in the carotid artery tissue in the atheromatosis and lipid spot areas. Universal pathogenesis of the atherosclerosis syndrome and its symptom of intimal atheromatosis 4
- Panchenko L.F., Terebilina N.N., Pyrozchkov S.V., Naumova T.A., Baronets V.Y., Balashova A.A., Garmash I.V.** Serum markers of fibrosis and endothelial dysfunction in patients with alcoholism, with varying degrees of liver fibrosis 18
- Shakova F.M., Kalinina T.I., Barskov I.V., Stelmashuk E.V., Genrix E.E., Yrin V.L., Romanova G.A.** Comparison of neuroprotective effects of derivatives of erythropoietine by different way of bringing in drugs with model of bilateral photochemically induced thrombosis of the prefrontal cortex of rat brain 28
- Kulikov V.P., Tregub P.P., Kovzelev P.D., Dorokhov E.A., Belousov A.A.** Hypercapnia — alternative hypoxia signal incentives to increase HIF-1 α and erythropoietin in the brain 34
- Vetrlie L.A., Fomina V.G., Nevidimova T.I., Vetlugina T.P., Batukhtina E.I., Savochkina D.N., Zakharova I.A., Davydova T.V.** Autoantibodies to glutamate and GABA in opiate addiction 38
- Bokhan N.A., Nevidimova T.I.** Relationship between sex hormones, pheromones, interleukine production and risk of drug dependence 44
- Yumatov E.A., Pertsov S.S., Dudnik E.N., Kramm M.N., Strelkov N.O.** Monitoring of human physiological functions during the daily night sleep 47
- Anikhovskaya I.A., Kubatiev A.A., Salakhov I.M., Tebloev K.I., Yakovlev M.Yu.** Changes of endotoxin concentration in blood serum in patients with uncomplicated acute myocardial Q-infarction 55
- Levin G.Ya., Sukhareva E.G.** The influence of erythrocyte-derived microvesicles on aggregation of platelets in burn injury 62
- Konenkov V.I., Borodin Yu.I., Makarova O.P., Bgatova N.P., Rachkovskaya L.N.** Effects of lithium carbonate nanosized particles on nitric oxide production and arginase activity in tumor and peritoneal macrophages in hepatocellular carcinoma 29 69
- Alieva T.R., Allahverdieva L.I.** The comparative characteristic of level of histamine, IgE and IgG in blood and the lymph at the experimental anaphylactic shock and Artyus phenomenon 76
- Otman I.N., Zozulya S.A., Sarmanova Z.V., Klushnik T.P.** Inflammatory and autoimmune reactions in different forms of nervous system functioning disorders 81
- Chausova S.V., Gurevich K.G., Bondareva G.P., Filatov O.Ju., Malyshev I.Y.** The role of cellular mediators in the development of the phenomenon of inhibition induced by barium sulfate luminol-dependent chemiluminescence of blood under the influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs in patients with intolerance to these drugs 89
- Volkov E.E., Reshetniak V.K., Domaratskaia E.I., Volkov A.E., Kucheranu V.G., Butorina N.N., Paulina O.V.** The effect of low frequency electrical stimulation on bone tissue regeneration 94
- Nikiforov N.G., Makeev V.J., Elizova N.V., Orekhov A.N.** Ability of human monocytes to activate in atherosclerosis 100

REVIEWS

- Zorin V.L., Zorina A.I., Pulin A.A., Kopnin P.B., Eremin I.I.** Prospects for the use of cells possessing myogenic potential in the treatment of skeletal muscle diseases: a review of research. Part 2 — Populations of stem cells of muscle and non-muscle origin 106
- Malyshev I.Y.** Epigenetic, post-transcriptional and metabolic mechanisms of macrophage reprogramming 118
- Nikiforov N.G., Kornienko V.Y., Karagodin V.P., Orekhov A.N.** Macrophage activation in atherosclerosis. Message 1: Activation of macrophages normally and in atherosclerotic lesions 128
- Alekseeva E.V., Popova T.S., Sal-nikov P.S.** Glutamatergic neurotransmitter system in regulation of the gastrointestinal tract motor activity 132

CHRONICLE

- Pigarevsky P.V., Chirsky V.S., Anichkov N.M.** To the 130th anniversary since the birth of the prominent pathologist N.N. Anichkov, academician of USSR Academy of sciences and Academy of medical sciences 150

© Коллектив авторов, 2015
УДК 616-092

Титов В.Н.¹, Осипов Г.А.², Тарарак Э.М.¹, Годков М.А.²

Жирные кислоты ткани сонных артерий в области атером и липидных пятен. Единение патогенеза синдрома атеросклероза и его симптома — атероматоза интимы артерий

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

² — НИИ скорой медицинской помощи им. Н.В. Склифосовского Комитета здравоохранения г.Москвы, 129090, Москва, Большая Сухаревская площадь, д. 3

Методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором на операционном материале показано, что основу атероматозных масс в сформированных бляшках составляют, главным образом, производные эссенциальных полиеновых жирных кислот (ЭС поли-ЖК) и спирта холестерина. Они подвергнуты афизиологичному катаболизму (гидролизу) в лизосомах оседлых макрофагов как компоненты макромолекул белка, липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). При избытке пальмитиновых триглицеридов apoB-100 в ЛПНП не сформировал лиганд; в крови безлигандные ЛПНП стали биологическим «мусором» и их поглощают оседлые макрофаги интимы через рецепторы мусорщика. Когда лигандные ЛПНП физиологично поглощают клетки через apoB-100 рецепторы, катаболизм их (окисление) происходит не в лизосомах, а в пероксисомах. Липидные пятна — результат функционального липоидоза клеток, которые реализуют биологическую реакцию воспаления; инициирует липоидоз — белок-вектор переноса ЖК — C-реактивный белок. Формирование безлигандных ЛПНП — основа дефицита в клетках ЭС поли-ЖК и клинической картины синдрома атеросклероза. Атероматоз интимы артерий эластического типа — основной клинический симптом атеросклероза. Интима — место сбора и утилизации биологического мусора больших размеров (более 70 кДа) из локального внутрисосудистого пула межклеточной среды.

Ключевые слова: жирные кислоты; холестерин; сонные артерии; атеросклероз; атероматоз

Titov V.N.¹, Osipov G.A.², Tararak E.M.¹, Godkov M.A.²

Fatty acid composition in the carotid artery tissue in the atheromatosis and lipid spot areas. Universal pathogenesis of the atherosclerosis syndrome and its symptom of intimal atheromatosis

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

² — N.V. Sklifosovsky Institute of Emergency Aid

Gas chromatography with mass spectroscopy detection have shown that the major components of atheromatous masses in formed atherosclerotic plaques (surgery material) are the derivatives of essential polyenic fatty acids (ES poly-FA) and of the alcohol cholesterol. They undergo nonphysiological catabolism (hydrolysis) in the lysosomes of resident macrophages as components of protein macromolecules, low-density lipoproteins (LDL). In excess of palmitic triglycerides apoB-100 of LDL does not form ligand, and ligand-free LDL become biological «rubbish» in the circulation. They are uptaken via scavenger receptors by resident macrophages in the intima. When ligand LDL are physiologically uptaken via apoB-receptors, they are catabolized (oxidized) in peroxisomes but not in lysosomes. Lipid spots result from functional cellular lipoidosis which fulfills the biological reaction of inflammation and initiate the lipoidosis — vector protein for FA transport — C-reactive protein pathway. Formation of ligand-free LDL lays the basis for intracellular ES poly-FA deficiency and clinical manifestations of the atherosclerosis syndrome. Intima is the spot where large-molecular-weight (>70 kD) biological rubbish is collected and utilized from a local intravascular pool of the intercellular medium.

Key words: fatty acids; cholesterol; carotid arteries; atherosclerosis; atheromatosis

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

Несмотря на достижения в лечении осложнений атеросклероза и атероматоза, и до настоящего времени не удалось:

- а) окончательно понять патогенез атеросклероза [1];
- б) объяснить морфологическую основу и локализацию патологического процесса [2];

в) отработать эффективные меры профилактики [3].

Почему апоВ-100 липопротеины (ЛП) из внутрисосудистого пула межклеточной среды оказываются в интима артерий эластического и смешанного типа? Этот афизиологичный процесс — реализация монослоем эндотелия активной, биологической реакции трансцитоза; это целенаправленный, энергозависимый перенос липопротеинов (ЛП) из сосудистого русла в интиму артерий [4]. Биологически роль спирта холестерина (ХС) столь велика, что его quantum sates синтезирует *in situ de novo* (из уксусной кислоты) каждая животная клетка; и ни одна из клеток не нуждается в подвозе ХС. В то же время, от каждой из клеток ХС необходимо отвозить, наравне с мочевиной и CO_2 . С позиций физической химии и общей биологии, клетки активно (рецепторно) поглощают полиеновые жирные кислоты (ПНЖК) только в неполярной форме, которая образуется при этерификации их спиртом ХС. Все раздельно, последовательно сформировавшиеся на ступенях филогенеза ЛП высокой плотности (ЛПВП), ЛП низкой плотности (ЛПНП) и наиболее поздняя, инсулинзависимая система ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП) [5], предназначены, в первую очередь, для переноса ЖК — насыщенных, моноеновых, ненасыщенных (НЖК, МЖК, ННЖК) и ПНЖК. Все тесты, которые использованы в диагностике атеросклероза (ХС плазмы крови, ХС-ЛПВП, ХС-ЛПНП), оценивают перенос ЖК в ЛП в форме эфиров со спиртами [6]. Спирт глицерин этерифицирует НЖК, МЖК и ННЖК с образованием неполярных триглицеридов (ТГ); спирт ХС превращает полярные ПНЖК в неполярную форму эфиров ХС, точнее в этерифицированные холестерином ПНЖК.

Теория гиперхолестеринемии по Н.Н. Аничкову постулирует экзогенное происхождение всех нарушений *in vivo*, в том числе и атероматоза интимы артерий — основного клинического симптома атеросклероза [7]. Причиной столь распространенной в популяции Ното сариенс «метаболической пандемии», как атеросклероз, является нарушение биологической функции трофологии (функции питания), биологической реакции экзотрофии (внешнего питания). Основным же патогенетическим фактором атеросклероза реально является не гиперхолестеринемия, а афизиологично высокое содержание в пище С16:0 пальмитиновой НЖК. Если заменить гиперхолестеринемию на экзогенную пальмитиновую НЖК, мно-

гие стороны атеросклероза станут более понятными [8]; пища в равной мере становится афизиологичной, если сформировать избыток не ХС, а пальмитиновой НЖК. Для экспериментов с ХС удачно выбран грызун — кролик с его особым переносом к клеткам ЖК в ЛП, который сходен с приматами. На многих же иных видах животных, модель экзогенной гиперхолестеринемии, воспроизвести не удастся. Важный постулат холестериновой теории состоит в том, что основой профилактики атеросклероза является нормализация биологической функции трофологии, функции питания.

Мы рассматриваем патогенез атеросклероза как патологию ЖК и с этих позиций объясняем особенности воспалительного и деструктивного процесса — атероматоза, который формируется в интима артерий, включая матрикс интимы, липидные пятна, пенные клетки (лаброциты), стабильные и склонные к разрыву атероматозные бляшки. Какие же физико-химические и биохимические изменения в ЛП являются основой того, что ЛПОНП и ЛПНП оказываются в интима? Каковы биологические основы процесса, в результате которого формируются гидрофобные, атероматозные массы, клеточный детрит и стеноз просвет артерий? Какие ЖК преобладают в плотных и склонных к разрыву мягких атероматозных бляшках? Для выяснения этого, мы определили состав ЖК в липидах, которые содержит интима + медиа сонных артерий, которые удалены при эндартерэктомии у пациентов с нарушением мозгового кровообращения — динамически значимого стеноза а. carotis. Степень нарушения кровообращения мозга достоверно отражают:

- а) толщина интимы + медиа при сонографии;
- б) площадь атероматозного поражения интимы сонных артерий;
- в) концентрация пальмитиновой НЖК в сыворотке крови [9].

Методика

Исследован операционный материал 19 пациентов; проведено удаление *ad mass* интимы + медиа а. carotis в зоне бифуркации. До определения ЖК и стерингов, ткани хранили в морозильнике при температуре $70^{\circ}C$. Для анализа использовали кусочки ткани сонных артерий:

- 1) без признаков атероматоза;
- 2) ткань липидного пятна;
- 3) края атероматозной бляшки;
- 4) центральной ее части.

Вырезали кусочки ткани (5—15 мг), взвешивали, помещали в стеклянный виал с винтовой крышкой и тефлоновой прокладкой, заливали 400 мкл 1М соля-

ной кислоты в метаноле, плотно завинчивали и подвергали кислотному метанолизу в течение часа при температуре 80°C. К охлажденной реакционной среде добавляли 300 нг стандартного образца (дейтерометиловый эфир тредекановой ЖК). После перемешивания содержимого на вортексе, смеси отстаивали при комнатной температуре в течение 5 мин.

Объединенный экстракт переносили в чистый виал, высушивали 7 мин. при температуре 80°C; к сухому остатку добавляли 25 мкл N,O-, бис(триметилсилил)-трифторацетамида и прогревали при +80°C 9 мин. Для анализа смеси метиловых эфиров ЖК в объеме 2 мкл вводили в инжектор газового хроматографа модели АТ-5973, фирма Agilent Technologies Inc, США. Хроматографию метиловых эфиров ЖК проводили на капиллярной колонке с метилсиликоновой неподвижной фазой модели HP-5ms этой же фирмы длиной 25 м и диаметром 0,25 мм; газ-носитель гелий. Режим анализа — программированный; скорость нагрева термостата колонки 7°C/мин в диапазоне 140-320°C. Выдержка 0,5 мин при начальной температуре и 3,5 мин при конечной. Температура испарителя 280°C; температура интерфейса 270°C. Масс-спектрометр квадрупольный с ионизацией электронами (70 эВ) использован в режиме селективных ионов (масс-фрагментографии) при периодическом сканировании до 30 ионов в пяти временных интервалах. Количество ЖК рассчитано согласно величине пиков на хроматограмме и внутреннего стандартного образца [10].

Использовали программное обеспечение, которое заложено в компьютере масс спектрометра; включая и библиотеку данных для идентификации ЖК. В таблицах представлено содержание индивидуальных ЖК в мкг/мг влажной ткани. Статистическая обработка результатов проведена с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6,0». Данные представлены в виде средних значений ($M \pm SD$). Сравнительный анализ количественных признаков проводили с помощью U критерия Манна-Уитни; различие считали достоверным при $p \leq 0,05$. Использование масс-спектрометрического детектора позволило определить:

а) содержание в ткани интимы + меди а. carotis физиологичных ЖК с четным числом атомов С, включая среднецепочечные, длинноцепочечные и очень длинноцепочечные НЖК, МЖК, ННЖК и ПНЖК с уменьшенным числом двойных связей (ДС);

б) среди них мы выделили метаболиты и продукты окисления in situ ПНЖК;

в) афизиологичные НЖК и МЖК с нечетным числом атомов С;

г) группу стеринов: холестерин, продукты его окисления, сквален и β -ситостерин.

Результаты представлены в таблицах. Ограниченное число проб сузило возможности статистической обработки результатов. Однако мы рассматриваем эту работу как пилотную, не только в плане комплексной оценки метаболических (катаболических) превращений ЖК и стеринов, но, в первую очередь, как иную оценку патологии формирования атероматозной массы липидов и биологической реакции воспаления; вначале это патология поглощения клетками НЖК и, а в конечном итоге, ПНЖК.

Использованы четыре участка для взятия проб:

- проба 1 — это «фоновая» величина с чем сопоставлялись результаты;

- проба 2 — липидное пятно; для верификации является ли оно ранним проявлением атероматоза или это физиологичный процесс — функциональный липоидоз клеток рыхлой соединительной ткани (РСТ);

- проба 3 — краевая зона бляшки, отражающая активность биохимических процессов в интимае, пролиферацию клеток, рост бляшки, в том числе и разрыв покрышки (монослоя эндотелия) на поверхности мягкой бляшки;

- проба 4 — срединная часть бляшки, где биохимические реакции могут быть не столь активными, если не упомянуть о возможных явлениях некроза, эрозии детрита, кристаллах моногидрата ХС, кальцификации некротизированных масс и отложения гемосидерина.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены показатели содержания физиологичных ЖК с четным числом атомов С в ткани сонной артерии. В липидном пятне, по сравнению с неизменной стенкой артерии, не увеличено содержание пальмитиновой НЖК, но вдвое выше количество ω -9 пальмитолеиновой МЖК, почти вдвое больше олеиновой МЖК при понижении стеариновой НЖК и почти двукратно увеличена концентрация линолевой ННЖК. Изменений в содержании ПНЖК — ω -6 арахидоновой (Арахи) и ω -3 докозагексаеновой (Докоза) не произошло, как и увеличение эндогенной ω -9 и экзогенной ω -6 дигомо- γ -линоленовой нена-ЖК. Это афизиологичная, эндогенно синтезированная С20:3 ННЖК, которую клетки используют как предшественник афизиологичных эйкозаноидов (простагландинов, тромбоксанов и лейкотриенов), если поглощение физиологичных Арахи, Эйкоза и Докоза ПНЖК оказывается блокированным. В использованном нами методе, на хроматограмме нет пиков ω -6- и ω -3 С18:3 линоленовой ННЖК, как и ω -3 С20:5 Эйкоза ПНЖК.

Таблица 1

Содержание физиологических жирных кислот в ткани сонной артерии

№	ЖК: название, формула	Участки ткани артерии			
		1 (n = 4)	2 (n = 4)	3 (n = 8)	4 (n = 3)
1	Миристиновая С 14:0	78,7 ± 9,5	74,3 ± 10,1	84,0 ± 10,3	69,3 ± 11,2
2	Пальмитилолиновая С 16:1 ω-9	128,3 ± 35,8	252,1 ± 44,9*	128,5 ± 17,2	197,2 ± 57,2
3	Пальмитиновая С 16:0	2730,8 ± 354,7	2991,6 ± 231,1	3495,4 ± 378,8*	2809,7 ± 237,5
4	Линолевая С 18:2	962,5 ± 241,0	1658,2 ± 236,0*	1507,5 ± 223,8	1925,3 ± 312,1
5	Олеиновая С 18:1	1393,4 ± 276,5	2289,0 ± 278,5*	1502,4 ± 219,3	3493,1 ± 902,6
6	Стеариновая С 18:0	1995,0 ± 366,2	1653,5 ± 142,1	1852,7 ± 366,3	1491,0 ± 176,1
7	Арахидоновая С 20:4	1039,5 ± 164,0	680,6 ± 76,1	855,4 ± 183,5	622,3 ± 43,0*
8	Дигомо-γ-линоленовая С 20:3	32,2 ± 14,1	56,6 ± 5,0	32,6 ± 11,6	42,0 ± 8,3
9	Дигомо-γ-линоленовая-2 С 20:3	92,7 ± 37,2	94,0 ± 10,2	171,2 ± 55,2	126,0 ± 12,5
10	Докозагексаеновая С 22:6	10,3 ± 2,8	14,3 ± 2,4	31,6 ± 1,6	13,4 ± 1,9

Примечание. * — различия статистически значимы

Таблица 2

Содержание афизиологических жирных кислот в ткани сонной артерии

№	ЖК: название, формула	Участки ткани артерии			
		1 (n = 4)	2 (n = 4)	3 (n = 8)	4 (n = 3)
1	Пальмитолеиновая С 16:1 ω-7	27,7 ± 6,5	46,6 ± 3,6	53,8 ± 6,8	34,3 ± 4,2
2	Изопентадекановая С 15:0	21,8 ± 5,2	23,3 ± 3,2	39,3 ± 2,6	23,0 ± 1,6
3	Гептадеценная С 17:1	21,7 ± 7,1	20,7 ± 3,7	16,6 ± 1,8	12,0 ± 1,6
4	Маргариновая С 17:0	76,3 ± 10,6	77,4 ± 8,8	80,1 ± 11,5	67,3 ± 6,8
5	Антеизогептадеценная С 17:1	29,2 ± 7,6	27,9 ± 3,1	12,5 ± 4,5	16,3 ± 4,5
6	Цис-вакценовая С 18:1 ω-11	259,5 ± 65,5	268,1 ± 44,2	1042,8 ± 149,1*	234,6 ± 65,3
7	Трикозановая С 23:0	22,7 ± 7,5	31,1 ± 4,6	34,2 ± 10,0	39,6 ± 6,2
8	Тетракозановая С 24:0	183,8 ± 63,8	185,3 ± 38,8	364,5 ± 106,5	198,3 ± 19,3

Примечание. * — различия статистически значимы

Таблица 3

Содержание в ткани сонной артерии производных ПНЖК

№	ЖК: название, формула	Участки ткани артерии			
		1 (n = 4)	2 (n = 4)	3 (n = 8)	4 (n = 3)
1	Эйкозодиеновая С 20:2	23,5 ± 9,3	12,7 ± 4,5	30,3 ± 9,0	201, ± 0,6
2	Эйкозеновая С 20:1	34,2 ± 5,3	33,5 ± 4,1	24,0 ± 8,4	35,6 ± 4,3
3	Эйкозановая С 20:0	76,5 ± 12,5	52,7 ± 10,1	79,7 ± 25,8	52,6 ± 2,5
4	Докозатетраеновая С 22:4	131,0 ± 16,8	115,4 ± 51,2	80,0 ± 26,0	38,3 ± 14,1*
5	Докозатриеновая С 22:3	16,7 ± 8,19	16,7 ± 7,5	36,2 ± 16,3	8,6 ± 2,3
6	Докозодиеновая С 22:2	8,1 ± 2,1	6,27 ± 2,0	5,12 ± 1,3	4,9 ± 0,4
7	Докозеновая С 22:1	39,3 ± 1,3	14,7 ± 5,1	16,2 ± 4,1	9,3 ± 0,7
8	Докозановая С 22:0	14,2 ± 4,5	7,5 ± 2,3	11,7 ± 8,8	4,5 ± 0,8
9	Тетракозеновая С 24:1	183,8 ± 63,8	185,3 ± 38,8	364,5 ± 106,6	198,3 ± 19,3
10	Тетракозановая С 24:0	221,5 ± 50,1	109,7 ± 54,3	215,2 ± 54,6	177,1 ± 12,6

Примечание. * — различия статистически значимы

Среди афизиологичных ЖК (табл. 2) увеличилось содержание ω -7 пальмитолеиновой МЖК, при неизменном уровне иных экзогенных и эндогенных афизиологичных ЖК. Часть ЖК могут быть синтезированы бактериями толстого кишечника (микробиотой) [11]. При оценке окисления и деградации метаболитов ПНЖК, (табл. 3), отмечено снижение содержания эйкозодиеновой ННЖК и двукратное уменьшение тетракозановой НЖК. Это можно расценивать как снижение физиологичного поглощения клетками ПНЖК в условиях их алиментарного дефицита.

Одновременно в области липидного пятна происходит усиление катаболизма ХС (табл. 4), при двукратном увеличении концентрации сквалена, полторном возрастании ХС, малом изменении оксхолестерина и четырехкратном увеличении β -ситостерина. Суммируя полученные результаты, можно полагать, что липидное пятно морфологически и функционально, физиологично выявляют локализацию (колонию) оседлых макрофагов. Эти клетки поглощают много липидов и ЖК в ЛПОНП или ЛПНП, по сравнению с неизменной стенкой а. carotis. Липидное пятно отражает особенности ЖК в липидах тех ЛПОНП и ЛПНП, которые оседлые макрофаги интимы усиленно поглощают при реализации биологической функции адаптации. Вероятно, это происходит при реализации иного поглощения ЛПОНП, чем апоЕ/В-100 и апоВ-100 рецепторного эндоцитоза. На это указывает выраженное увеличение содержания в липидном пятне олеиновой МЖК, по сравнению с пальмитиновой НЖК и повышение содержания ω -9, так и ω -7 пальмитолеиновой МЖК. При этом усилен метаболизм (катаболизм) возросшего количества поглощенного клетками в составе ЛП спирта ХС, который клеткам не нужен. Вероятно, в составе поглощаемых клетками ЛПНП, действительно понижено содержание ПНЖК.

Край атероматозной бляшки — место активной реализации биологической функции эндоекологии, биологической реакции воспаления. Здесь реализованы:

- а) биохимические и цитологические реакции увеличения размеров (роста) бляшки;
- б) формируются новые «пенистые» клетки;

в) условия для разрыва покрывки мягких атером.

По сравнению с неизменной стенкой артерии, в краевой зоне, в большей мере, чем и в липидном пятне, увеличено содержание пальмитиновой НЖК, но меньше олеиновой МЖК, стеариновой НЖК и Арахидиновой ПНЖК. Почти вдвое увеличена концентрация ω -9 С20:3 дигомо- γ -линоленовой ННЖК и в три раза содержание Докоза. Это можно расценивать так, что в краевой зоне на фоне гибели одних пенистых клеток происходит формирование новых, которые накапливают ПНЖК в форме катаболитов, эфиров со спиртом ХС. Одновременно в краевой зоне бляшки вдвое увеличено содержание ω -7 пальмитолеиновой МЖК, в 4 раза возросла концентрация афизиологичной ω -11 цис-вакценовой МЖК и вдвое тетракозановой НЖК. Среди метаболитов ПНЖК увеличено количество только тетракозановой НЖК; ее содержание, по сравнению с липидным пятном, увеличено вдвое. В краевой зоне метаболизм ХС проходит более активно, но во многом афизиологично, что и отличает афизиологичные бляшки от физиологичных процессов в липидном пятне.

В середине атероматозной бляшки несколько меньше содержание пальмитиновой НЖК, по сравнению с краевой зоной, в 2 раза большее количество линолевой ННЖК, вдвое увеличено количество олеиновой МЖК, меньше стеариновой НЖК и в два раза меньше Арахидиновой ПНЖК. По сравнению с краем бляшки, в 4 раза меньше цис-вакценовой афизиологичной НЖК и вдвое тетракозановой НЖК. В средней части бляшки в меньшей мере происходит катаболизм ПНЖК при насыщении их двойных связей (с 5—6 ДС до 2—3) и укорочении цепи ЖК. По сравнению с неизменной стенкой, в середине бляшки увеличена концентрация сквалена и ситостерина и в меньшей мере содержание ХС и оксхолестерина.

Физико-химические и биохимические реакции формирования атероматозных масс, липидного детрита в интима артерий, как и механизмы разрыва покрывки мягких атером привлекают внимание исследователей в течение длительного времени. В составе бляшек (материал аутопсий) нарушен состав ЖК, по сравнению с интактными неповрежденными участками артерий

Таблица 4

Содержание стеридов в ткани стенки сонной артерии

№	Стериды	Участки ткани артерии			
		1 (n = 4)	2 (n = 4)	3 (n = 8)	4 (n = 3)
1	Сквален	140,5 ± 20,8	285,9 ± 62,8*	220,3 ± 53,8	227,3 ± 15,8
2	Холестерин	11065,2 ± 2474,0	16846,9 ± 1101,3	16308,5 ± 1395,1	13779,8 ± 1299,3
3	Оксхолестерин	37,8 ± 12,5	59,13 ± 2,8	89,7 ± 20,6	75,6 ± 8,5
4	β -ситостерол	37,4 ± 5,8	144,6 ± 13,1	49,6 ± 12,8	63,6 ± 9,6

Примечание. * — различия статистически значимы

[12]; в ЖК уменьшается число ДС и укорачивается длина цепи. Особенности липидов (липидома) [13] атероматозных масс наиболее часто оценивают методом газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором. Используют также метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР) [14], включая и внутрисосудистое его применение *in vivo* [15], а также позитронно-эмиссионную томографию [16]. Синтез пальмитиновой НЖК из [¹⁴C]ацетата происходит физиологично и в клетках артериальной стенки [17] параллельно с отложением в интима атероматозных масс; применены методы иммуноморфологии [18] и микробиологии. Однако важно понять, в силу каких анатомических и функциональных причин *in vivo*, клетки монослоя эндотелия переносят и концентрируют в интима артерий только эластического типа и только апоВ-100 ЛП, но не ЛПВП. ЛПОНП и ЛПНП, выделенные из ткани интима + медиа а. carotis, по составу липидов, размерам и форме (данные электронной микроскопии с негативным контрастированием) во многом сходны с теми ЛП, которые циркулируют в кровотоке. Однако и первые, и вторые выражено отличаются от ЛП, которые циркулируют в крови здоровых добровольцев [19]. ЛПНП, которые монослой эндотелия переносит в интиму артерий, это афизиологичные ЛП с измененным составом ЖК. В них апоВ-100 не сформировал апоВ-100 лиганд и поэтому их не могут поглотить клетки путем активного, рецепторного эндоцитоза; в крови они становятся биологическим «мусором». Вот их-то клетки монослоя эндотелия и переносят их в интиму артерий — в локальный пул сбора и утилизации биологического «мусора» из внутрисосудистой межклеточной среды, из плазмы крови [20].

Используя методы липидологии (липидома) при применении ЯМР спектроскопии, в тканях и биологических жидкостях можно определить более 150 липидов [21]; в атероматозной массе артерий удается выявить только 24 липида. В атероматозной массе интимы в отсутствии клеток существенно меньше ЖК с более чем двумя ДС [12]; если же обратить внимание на положение ДС в цепи атомов углерода, оказывается, что большинство из них это продукты катаболизма ω -3 и ω -6 ПНЖК и спирта ХС, которым они этерифицированы. Образование катаболитов ПНЖК, есть результат сатурации (насыщения) их и укорочения (табл. 3). Это дает основание говорить, что атероматозные массы в интима артерий при атеросклерозе образованы в результате того, что:

а) безлигандные ЛПНП как биологический «мусор», в интима поглощают оседлые макрофаги через сквенджер-рецепторы (рецепторы-мусорщики); при этом макрофаги «воспринимают» ЛПНП как макромолекулы белка;

б) ЛП подвергаются протеолизу в лизосомах; в результате этого макрофаги катаболизируют ПНЖК с 4-6 ДС с образованием НЖК и МЖК;

в) накопление в цитозоле макрофагов катаболитов ПНЖК, ННЖК и ХС и образует пенные клетки (лаброциты); далее

г) пенные клетки путем экзоцитоза выводят атероматозные массы в интиму или детрит ПНЖК оказываются в матриксе в результате гибели макрофагов (лаброцитов) по типу некроза. Так происходит формирование основных компонентов атероматозного детрита. Пальмитиновую НЖК и олеиновую МЖК, которых порой много в ЛПОНП с плотностью ЛПНП, макрофаги и мигрировавшие из кровотока моноциты гематогенного происхождения, окисляют в митохондриях при синтезе АТФ. Функции макрофагов, утилизация ими биологического «мусора» (в частности, безлигандных ЛПНП) требует большого количества АТФ. Почему же после утилизации макрофагами ЛПНП остается столь много катаболитов ЖК и ХС?

Высокая функциональная активность специализированных фагоцитов, — «чистильщиков», реализована в полной утилизации эндогенных флогогенов (инициаторов биологической реакции воспаления) и экзогенных, инфекционных патогенов. В то же время филогенетически ранние макрофаги интимы артерий не могут гидролизовать два субстрата: а) ПНЖК этерифицированные спиртом ХС и гем гемоглобина. Разобраться в происходящем можно на основании филогенетической теории общей патологии [22]. Макрофаги начали функцию на ранних ступенях филогенеза, когда не было синтеза апоВ-100 и ЛПНП; все ЖК они поглощали (и поглощают) пассивно из ЛПВП; апоВ-100 рецепторов на мембране макрофагов нет. Филогенетически ранние макрофаги не поглощают ЛПНП и в лизосомах они не имеют кислых гидролаз, которые могли бы гидролизовать эфиры ХС. Когда макрофаги физиологично поглощают ЛПНП через апоВ-100 рецепторов, превращения их в клетках происходят в иных органеллах — пероксисомах, а не лизосомах. Однако через рецепторы-мусорщики макрофаги поглощают ЛПНП как макромолекулы белка, не «зная» о содержании в них ПНЖК этерифицированных ХС. Все поглощенные ПНЖК макрофаги в лизосомах превращают в атероматозную массу только после частичного их гидролиза, а не окисления, как это физиологично происходит в пероксисомах; то же происходит и при частичном гидролизе спирта ХС, фосфолипидов и иных субстратов, которые ЛПНП переносят к клеткам. Сколь велико:

а) при нарушении биологической функции питания, содержание пальмитиновой НЖК в пальмитиновых ТГ и одноименных ЛПОНП;

б) сколь много формируется в крови афизиологич-ных ЛПОНП с плотностью ЛПНП, которые не формируют апоВ-100 лиганд;

в) столь много атероматозной массы из липидов образуют макрофаги в лизосомах, депонируют в цитозоле, формируют пенистые клетки и выводят содержимое их в интиму, и тем

г) в большей мере происходит формирование атероматоза — основного клинического симптома/синдрома атеросклероза.

Согласно филогенетической теории общей патологии, ранние в филогенезе макрофаги как универсальные фагоциты, утилизируют и ранние формы гемоглобина. Однако гем гемоглобина — структура тетрапиррола сформировалась, вероятно, в филогенезе позднее, чем макрофаги; поэтому утилизировать его могут только столь же филогенетически поздние клетки селезенки спленоциты, превращая гем (простетическую группу гемоглобина) в две молекулы билирубина. Если же при снижении осмотической резистентности эритроцитов и гемолизе в плазму крови выходит гемоглобин, его связывает специфичный белок острой фазы воспаления гаптоглобин, формируя комплекс гаптоглобин + гемоглобин. Его после физиологичной опсонизации компонентами комплемента клетки монослоя эндотелия выносят в интиму артерий эластического типа, реализуя биологическую реакцию транцитоза в биологической функции эндозеологии. Поглощая комплекс опять-таки как макромолекулу белка, через рецепторы-мусорщики, гидролизуют гемоглобин в лизосомах, гем гидролизует не подвергается и остается в интиму в форме гемосидерина, компонента атероматозной массы липидов.

Согласно биологии, все, что *in vivo* синтезировано из уксусной кислоты, из ацетата, подлежит метаболическим превращениям в пероксисомах при действии семейства оксидаз. Это относится ко всем ЖК, спирту ХС, каротину, токоферолу, флаваноидам, флавонам, фибратам и глицеринам [23]. Однако ЛПНП, вместе со спиртом ХС, которым этерифицированы ПНЖК, поглощают макрофаги и катаболизируют его не физиологично в пероксисомах, а афизиологично в составе лизосом при действии не оксидаз, а гидролаз. Поэтому в атероматозных массах велико содержание окисленного ХС — моногидрата, который уже в цитозоле макрофагов начинает образовывать кристаллы. Если катаболизм ХС физиологично происходит в пероксисомах гепатоцитов, продуктами его являются физиологичные желчные кислоты, а не ХС моногидрат в форме игольчатых кристаллов. Последние макрофаги выводят в межклеточную среду, используя для этого биологическую реакцию отторжения, реакции шеддинга (shedding). Кристаллов ХС-моногидрата много в больших по площади, плотных, гемо-

динамически мало значимых атероматозных бляшек. Массы липидов, располагаясь в интиму, суживают просвет и вызывают ремоделирование артерий таким образом, что просвет их, даже выражено уменьшенный в диаметре, имеет в сечении круг. Лишенные кровоснабжения, при гипоксии атероматозные массы частично катаболизируют ЖК с включениями элементов РСТ (коллагена и эластина) матрикса интимы артерий, постепенно подвергаются некрозу и кальцификации. Плотные атероматозные бляшки не рвутся, но некротизированные ткани в центральной их части могут подвергаться эрозии. Это инициирует формирование пристеночного тромба с клиническими симптомами нестабильной стенокардии [24]. При этом возможно образование эмболов из некротизированного детрита, как и из массы ТГ.

Наиболее часто разрыву подвержены покрывки мягких атероматозных бляшек, в составе которых много пальмитиновой НЖК и олеиновой МЖК в форме ТГ; они-то и определяют мягкую консистенцию. Разрыв происходит в области переднего «плеча» атероматозной, мягкой бляшки, которое в большей мере испытывает гидродинамическое воздействие потока крови, реализуя афизиологично возросшую реакцию сдвига на поверхности (мембране) эндотелия [25]. К тому же в краевой зоне бляшек наиболее активно скапливаются моноциты — клетки «рекруты» гематогенного происхождения, которые инфильтрируют интиму и постепенно трансформируются в функциональные макрофаги. У края бляшки наиболее активны и биохимические процессы формирования макрофагами атероматозных масс, которые скапливаются в пенистых клетках, но еще не в матриксе интимы. В краевой зоне бляшек высоко содержание мРНК для гормонзависимой липазы [26], гормон зависимого фермента, который в макрофагах гидролизует ТГ сразу на четыре части: три молекулы ЖК — полярных неэтерифицированных ЖК (НЭЖК) и спирт глицерин. В атероматозной ткани а. carotis высоко содержание НЭЖК и ТГ, которые расположены на наружной поверхности плазматической мембраны макрофагов [27].

Формированию острого коронарного синдрома предшествует эмоциональный или физический стресс. Повышение гидродинамического давления на передней плечо мягкой бляшки из ТГ может быть тем механизмом, который приводит к ее разрыву [28]. Филогенетически ранние макрофаги, продолжая реализовать биологическую функцию внеклеточного пищеварения, депонируют ТГ не только в липидных каплях цитозоля, но и на наружной поверхности плазматической мембраны. При реализации биологической функции адаптации, биологической реакции стресса, активация адреналином липолиза в макрофагах акти-

вирует гидролиз и тех ТГ, которые депонированы на плазматической мембране у монослоя эндотелия. В результате быстрой активации липолиза, из одной молекулы неполярных ТГ образуются четыре полярные молекулы (три НЭЖК и гидрофильный спирт глицерин). Объем, занимаемый этими молекулами, становится существенно больше и продукты реакции, изнутри при локальном повышении давления, повреждают покрывку мягкой атеромы. Это может происходить одновременно с реализацией гидродинамического давления, напряжения сдвига на эндотелии, которое действует снаружи бляшки [29]. Избыточное давление выталкивает ткань интимы в просвет артерии и образуется тромб, который закрывает весь просвет артерии, инициируя клиническую картину острого коронарного синдрома.

Определение ЖК, ХС и его метаболитов в области липидного пятна выявило увеличение содержания НЖК и МЖК, снижение концентрации ПНЖК и отсутствие нарушений в метаболизме ХС, при сравнении с непораженной тканью интима + медиа а. саготис. При этом содержание пальмитиновой НЖК и олеиновой МЖК одинаково, но выше фоновых значений [29]. В липидных пятнах нет нарушений катаболизма ПНЖК и спирта ХС, которые характерны для ткани пораженных атероматозом участков артерии. Создается впечатление, что макрофаги в области липидного пятна усилительно поглощают иные ЛП, которые формируют атероматоз. Кроме того, в области липидных пятен выявлено высокое содержание С-реактивного белка [30]. Это дает основание полагать, что формирование липидных пятен в интима — это функционально иной процесс, непосредственно не связанный с атероматозом.

Согласно нашим представлениям, формирование липидных пятен (полос) в интима артерий эластического типа является проявлением биологической функции эндозекологии — поддержания «чистоты» межклеточной среды *in vivo* путем реализации биологической реакции воспаления. Со времен И.И. Мечникова поглощение и окончательную утилизацию функциональными фагоцитами чего-либо *in vivo* мы именуем биологической реакцией воспаления. Согласно филогенетической теории патологии, макромолекулы белка, которые выходят в плазму крови и не имеют в ней функциональной роли, системы организма (Толл-подобные рецепторы моноцитов) [31] воспринимают как биологический «мусор». Он подлежит утилизации функциональными фагоцитами (оседлыми макрофагами) в пуле сбора и утилизации биологического «мусора». Для внутрисосудистого пула межклеточной среды, пул РСТ и оседлые макрофаги располагаются в интима артерий эластического типа. Поэтому все белки с мол. массой более 70 кДа, которые невозможно профильтровать через мембрану гло-

мерул нефрона, физиологично, путем биологической реакции трансцитоза, монослой эндотелия переносит в интиму артерий.

Для утилизации макрофагами биологического «мусора» требуется много энергии, АТФ, большое количество НЖК + МЖК как субстратов для окисления в митохондриях. Мы полагаем, что на ступенях филогенеза эту функцию *in vivo* реализует С-реактивный белок (СРБ) в форме пентамера, пентраксина. Если СРБ мономер является иммуномодулятором, то СРБ пентамер, мы полагаем, это белок — вектор направленного переноса к клеткам НЖК+МЖК для наработки АТФ [32]. На более поздних ступенях филогенеза СРБ стал переносить субстраты для окисления в митохондриях — НЖК+МЖК в форме ТГ в апоЕ/В-100 ЛПОНП. Замусоривание межклеточной среды *in vivo* «мусором» большой мол. массы выявляют Толл-подобные рецепторы; они же инициируют и синтез СРБ. В плазме крови СРБ связывается с ЛПОНП; его инициирует ассоциированная с ЛП фосфолипаза А₂ [33]. СРБ перекрывает апоЕ/В-100 лиганд, сам становится лигандом и переадресует перенос ЛПОНП только к клеткам РСТ, которые выставляют на поверхность кооперативный лиганд СРБ+CD36 — рецептор для ЖК [34]. Так при повышении содержания в плазме крови биологического «мусора» большой мол. массы формируется функциональный липидоз клеток РСТ, которые участвуют в реализации биологической функции эндозекологии, биологической реакции воспаления. Поэтому весь биологический «мусор», включая и экзогенные инфекционные патогены (бактерии, хламидии [35], вирусы) оказываются в интима макрофагов. И если мы говорим, что биологическая роль инсулина — это обеспечение энергией биологической функции локомоции, функции движения [36], то биологическая роль СРБ — обеспечение энергией биологической функции эндозекологии, реакции воспаления. Поэтому столь часто липидные пятна выявляют в интима артерий у детей при аутопсии; это физиологичный, достоверный, неспецифичный тест активации биологической реакции воспаления. Липидные пятна в ткани а. саготис являются проявлением функционального липидоза клеток РСТ, выявляя скопление в интима оседлых макрофагов; формирование и исчезновение их является процессом динамичным. При функциональном липидозе макрофаги (все клетки РСТ) активно поглощают ЛПОНП, в которых много пальмитиновой НЖК, олеиновой МЖК, апоЕ, но нет линолевой, линоленовой ННЖК и ПНЖК [37]. Эти-то различия в содержании индивидуальных ЖК между липидным пятном и атероматозом и подтверждают данные, приведенные в таблицах.

Многие авторы полагают, что к деструктивному процессу атероматоза в интима артерий эластического типа присоединяется биологическая реакция воспаления С позиций же филогенетической теории патологии, сбор во внутрисосудистой среде и утилизация функциональными фагоцитами любого биологического «мусора» большой мол. массы являются многоэтапной, но единой биологической реакцией воспаления — удаление из межклеточной среды и утилизация «мусора» большой мол. массы. Если плазма крови «замусорена» любым экзогенным инфекционным патогеном или безлигандными ЛПНП, все этапы биологической реакции воспаления будут теми же, все они подчиняются единому алгоритму. Естественно, что этиологические особенности индивидуальных патогенов добавляют к единому алгоритму специфические черты и клинические симптомы. Напомним, что в реализации биологической функции эндоэкологии (поддержание «чистоты» межклеточной среды *in vivo*) задействована не только биологическая реакция воспаления, но и иные биологические реакции. Это:

- 1) биологическая реакция экскреции;
- 2) биологическая реакция гидродинамического, артериального давления;
- 3) биологическая реакция трансцитоза;
- 4) биологическая реакция гипертермии;
- 5) биологическая реакция системного воспалительного ответа;
- 6) биологическая реакция компенсаторной противовоспалительной защиты;
- 7) биологическая реакция врожденного и приобретенного иммунитета;
- 8) биологическая реакция компенсации;
- 9) биологическая реакция стресса.

И все они действуют в рамках единого алгоритма патогенеза заболевания.

Позитивным в холестериновой теории атеросклероза является то, что основой патогенеза атероматоза названо нарушение биологической функции трофологии, функции питания, биологической реакции экзотрофии — внешнего питания. В эксперименте на кроликах нарушение биологической функции питания вызвано добавлением в пищу избытка ХС, который не является липидом. В популяции человека основой формирования атеросклероза и атероматоза является избыточное содержание в животной пище липидов — пальмитиновой НЖК и ее афизиологичное влияние [38]; одновременно в такой пище увеличено и содержание ХС. Много работ посвящено отдельным этапам патогенеза атеросклероза как синдрома дефицита в клетках ПНЖК и патогенезу его основного клинического проявления — атероматозу. Это разные процессы, но с общим патогенезом. Мы приводим схему (алгоритм) патогенеза отдельно атеросклероза и

атероматоза при наиболее частой из причин [39] — при избытке в пище пальмитиновой НЖК и ее афизиологичным действием [40].

Основными этапами патогенеза атеросклероза являются:

- избыточное содержание в пище пальмитиновой НЖК [41, 42] →
- формирование в гепатоцитах пальмитиновых ТГ и одноименных ЛПОНП →
- низкая скорость гидролиза пальмитиновых ЛПОНП и медленное формирование апоЕ/В-100 лиганда →
- поглощение клетками только малого количества и только лигандных ЛПОНП путем апоЕ/В-100 эндоцитоза →
- обретение безлигандными ЛПОНП гидратированной плотности ЛПНП по причине перехода в них ЭС поли-ЖК этерифицированных спиртом ХС из ЛПВП в (формально) ЛПНП →
- низкая скорость гидролиза ТГ в ЛПНП и медленное формирование апоВ-100 лиганда →
- образование безлигандных ЛПНП, которые не могут поглотить клетки путем апоВ-100 →
- превращение безлигандных ЛПНП в биологический «мусор», физиологичная денатурация их нейтрофилами [43] при окислении апоВ-100 [44], опсонизация компонентами комплемента [45] →
- вынос монослоем эндотелия всех базилигандных ЛПНП в интиму артерий — пул утилизации биологического «мусора» из плазмы крови и биологической реакции трансцитоза.

Заметим, что афизиологичных пальмитиновых ЛПОНП гепатоциты образуют в 10-15 раз больше, чем физиологичных линолевых ЛПОНП, в которые в норме переходят из ЛПВП все ПНЖК этерифицированные спиртом ХС. При этом ПНЖК, вместо поглощения их клетками путем апоВ-100 рецепторного эндоцитоза, оказываются в интима артерий, в пуле РСТ — пуле утилизации биологического «мусора». Все это формирует синдром дефицита в клетках ЭС поли-ЖК, проявлением чего и является широкая клиническая симптоматика атеросклероза. Клиническая картина атеросклероза формируется *in vivo* в результате:

- а) синтеза клетками РСТ *in vivo* биологически активных эйкозаноидов — простагландинов (простагландинов), тромбксанов и лейкотриенов не из физиологичных ω -3 С 20:5 Эйкоза и ω -6 С 20:4 Арахид как в норме, которые клетки не поглощают, а из эндогенной ω -6 С 20:3 дигомо- γ -линоленовой ННЖК: при этом вместо эйкозаноидов группы три с тремя ДС, в рамках биологической функции адаптации, биологической реакции компенсации, происходит синтез эйкозаноидов группы 1 с одной ДС; при этом патологические простагландины проявляют свойства

не вазодилатора, а вазоконстриктора; тромбоксаны группы 1 не ингибируют, а активируют агрегацию клеток (тромбоцитов), а лейкотриены активируют любую по этиологии биологическую реакцию воспаления (рисунок).

б) отсутствие в плазматической мембране аминокислоты — фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина, которые содержат ПНЖК; они вокруг каждого интегрального белка в плазматической мембране формируют менее гидрофобное окружение в выражено гидрофобной мембране из фосфатидхолинов [46]; отсутствие ПНЖК и аминокислоты нарушает функцию всех встроенных в мембрану интегральных белков, включая рецепторы, транспортеры субстратов (глюкозные транспортеры), ионов, включая Na^+ , K^+ АТФ-азу, и все физиологические сигнальные системы;

в) снижает окисление клетками в пероксисомах избыточного количества экзогенной пальмитиновой НЖК, которое происходит без образования АТФ; это определено тем, что ПНЖК являются физиологично наиболее активными экзогенными агонистом рецепторов активации пролиферации пероксисом [47].

Суммируя столь многочисленные стороны патогенеза атеросклероза с позиций филогенетической теории общей патологии, его обоснованно именовать синдромом.

С активации функции монослоя эндотелия и реализации биологической реакции трансцитоза, с выведения безлигандных ЛПНП в интиму артерий эластического типа, начинается патогенез атероматоза. Это, в первую очередь, воспалительный (реализация биологической функции эндоэкологии) и, только во вторую очередь, деструктивный процесс [48], который включает:

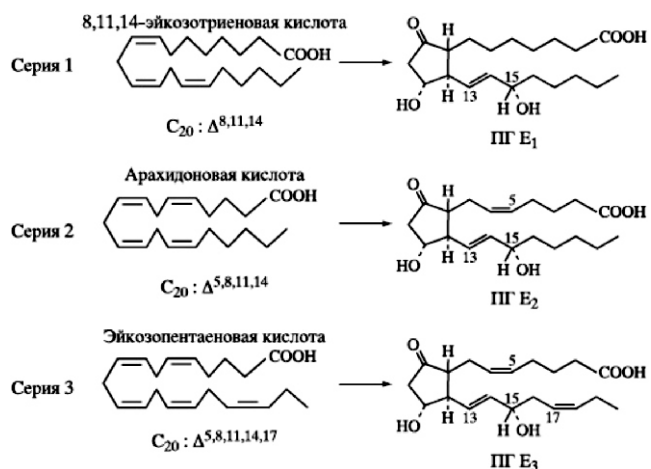
- связывание афизиологических ЛПНП с матриксом интимы [49] →
- синтез оседлыми макрофагами внеклеточных протеаз (металлопротеиназ), секреция их, деструкция матрикса [50] вместе с сорбированным биологическим «мусором»; процесс на уровне паракринных сообществ клеток, как а все иные процессы на этом уровне, регулирует ангиотензин II, который синтезируют клетки РСТ [51] →
- поглощение макрофагами денатурированных ЛПНП через сквенджер-рецепторы (рецепторы — мусорщики) [52] в форме ЛП как макромолекул белка →
- протеолиз апоВ-100 в лизосомах и невозможность гидролиз ЭС поли-ЖК этерифицированных спиртом ХС →
- накопление частично гидролизованных (ПНЖК с меньшим числом ДС) в бляшках [53] вместе с катаболитами ХС (холестерин моногидрат)

в цитозоле макрофагов с формированием пенистых клеток (лаброцитов) →

- выведение катаболитов из макрофагов путем экзоцитоза [54] и выход их при гибели лаброцитов по типу некроза формирует внеклеточную атероматозную массу липидов; расположенная под эндотелием атероматозные массы суживают просвет артерии, вызывают ее ремоделирование и по краю инициируют гибель следующих поколений трансформированных из моноцитов макрофагов [55] при постоянном стремлении этих клеток атероматозные массы повторно фагоцитировать [56] →

- разрыв покрывки мягкой атеромы или эрозия плотной атеромы с большим количеством кристаллов холестерина моногидрата, приводит к деструкции бляшки, формированию атеротромбоза и клинической картине острого коронарного синдрома. После воздействия металлопротеиназ секретированных макрофагами, часть гладкомышечных клеток изменяют свой фенотип [57], из сократительных они становятся секреторными и восполняют количество гидролизованного матрикса в интима; включая гликозамингликаны, волокна коллагена и эластина.

Атероматоз это основной клинический симптом синдрома атеросклероза; это объективное проявление «болезни накопления». Мы полагаем, согласно изложенному нами патогенезу атероматоза формируются и иные нозологические формы «болезней накопления», в частности, болезнь Альцгеймера. При этом заболевании в бляшках которые формируются в межклеточной среде головного мозга формируются включения [58], в котором одновременно с β -амиоидами содержится много неэтерифицированного ХС и



Структура предшественников синтеза эйкозаноидов (эйкозатриеновая НЖК, эйкозатетра- и эйкозопентаеновая ПНЖК) и структура афизиологических простагглиинов первой серии, физиологических — второй и высокоактивных — третьей группы. ПГ E₃ — серия простагглиинов.

апоЕ. Однако синдром атеросклероза нет оснований относить к протеинопатиям, поскольку нарушение конформации апоВ-100 и не образование апоВ-100 лиганда является динамичным, вторичным процессом и определено связыванием апоВ-100 афизиологичного количества экзогенных пальмитиновых ТГ и избыточным формированием одноименных ЛПОНП.

Если в теории экзогенной гиперхолестеринемии заменить спирта ХС на пальмитиновую н-ЖК, основные положения теории остаются в силе, особенно понимание формирования атеросклероза и атероматоза как нарушения биологической функции трофологии, биологической реакции экзотрофии. Иницируют синдром атеросклероза и его основной клинический симптом — атероматоз интим артерий эластического типа два фактора;

а) избыточное содержание в пище пальмитиновой НЖК (больше 15% всех ЖК в пище) и, в меньшей мере,

б) избыточное количество в пище углеводов, поскольку почти вся экзогенная ГЛЮ инсулинозависимые гепатоциты и адипоциты используют в липогенезе, в синтезе эндогенной пальмитиновой НЖК.

Факторами, которые противодействуют формированию атеросклероза является высокое содержание в пище среднецепочечных НЖК, МЖК (особенно олеиновой) и ПНЖК; наиболее активно действуют ω -3 ЖК рыбьего жира и морепродуктов [59]. При этом отношение ω -6/ ω -3 ПНЖК должно быть ≤ 5 . Однако при атеросклерозе именно ПНЖК становятся основным субстратом формирования атероматоза. Применение пациентами ω -3 ПНЖК в форме этиловых эфиров в течение нескольких недель перед эндартерэктомией, увеличивает в интима содержание ПНЖК, уменьшает морфологическую картину воспаления и делает бляшку более стабильной.

В книге, которая названа «Первичный и вторичный атеросклероз, атероматоз и атеротромбоз», мы обратили внимание на то, что атеросклероз *in vivo* наиболее часто инициируется избыточным содержанием в пище пальмитиновой НЖК, а завершается формированием в клетках дефицита ПНЖК. Только при семейной гиперхолестеринемии, при гиперлипотеинемии фенотипа II формирование атеросклероза начинается с дефицита в клетках ПНЖК при нормальном содержании ТГ. Мы полагаем, что семейную гиперхолестеринемию, при отсутствии на мембране апоВ-100 рецепторов можно рассматривать как первичный атеросклероз. В том же случае, когда первично нарушен перенос в составе ЛП и поглощение клетками н-ЖК, формируется гипертриглицеридемия и это является причиной дефицита в клетках ПНЖК, можно рассматривать как вторичный атеросклероз. Поэтому ведущим симптомом, на который в первую

очередь надо обращать пристальное внимание — это гипертриглицеридемия. Именно с нее, с избытка в пище пальмитиновой НЖК начинается формирование не только атеросклероза, но и метаболического синдрома, ожирения и синдрома резистентности к инсулину.

Список литературы

1. Чазов Е.И. История изучения атеросклероза: истины, гипотезы, спекуляции. *Тер. архив.* 1998; 9: 9-16.
2. Тутов В.Н. *Филогенетическая теория общей патологии. Патогенез болезней цивилизации. Атеросклероз.* М.; ИНФРА-М.
3. Кухарчук В.В., Тарарак Э.М. Атеросклероз: от А.Л. Мясникова до наших дней. *Кардиол. вестник.* 2010; 1: 1-6.
4. Тутов В.Н. *Атеросклероз как патология полиеновых жирных кислот. Биологические основы теории атерогенеза.* М.: Фонд «Клиника XXI века». Изд-во АЛТУС. 2002.
5. Тутов В.Н. *Атеросклероз как патология полиеновых жирных кислот. Биологические основы патогенеза, диагностики, профилактики и лечения атеросклероза.* М.: Фонд «Клиника XXI века» изд-во АЛТУС; 2002.
6. Kanjuh V., Ostojic M., Lalic N. et al. Low and high density lipoprotein—cholesterol and coronary atherothrombosis. *Med. Pregl.* 2009. 62; 3: 7-14.
7. Аничков Н.М. Перов И. Вирхов: 150 лет изучению клеточной патологии. *Архив патологии.* 2009; 71(1): 3-8.
8. Johnsen S.H., Mathiesen E.B. Carotid plaque compared with intima-media thickness as a predictor of coronary and cerebrovascular disease. *Curr. Cardiol. Rep.* 2009; 11(1): 21-7.
9. Mahe G., Ronziere T., Laviolle B. et al. An unfavorable dietary pattern is associated with symptomatic ischemic stroke and carotid atherosclerosis. *J. Vasc. Surg.* 2010; 52(1): 62-8.
10. Osipov G.A., Turova E.S. Studying species composition of microbial communities with the use of gas chromatography-mass spectrometry: microbial community of kaolin. *FEMS Microbiol. Rev.* 1997; 20: 437-46.
11. Осипов Г.А., Парфенов А.И., Верховцева Н.В. и др. Количественный *in situ* анализ микробиоты кишечной стенки и фекалий методом газовой хроматографии — масс спектрометрии. *Клин. лаб. диагн.* 2004; 9: 67-8.
12. Geer F.C., Panganamala R.V., Cornwell D.G. Position of double bonds in the fatty acids of cholesterol esters from human aorta. *Atherosclerosis.* 1970; 12: 63 — 74.
13. Ecroos K., Janis M., Tarasov K. et al. Lipidomics: a tool for studies of atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2010; 12: 273-81.
14. Navaravong L., Steenson C., Sigurdsson G. Coronary plaque type and burden by computed tomography angiography without association to C-reactive protein. *N. Am. J. Med. Sci.* 2014; 6(6): 260-5.
15. Wildgruber M., Swirski F.K., Zenecke A. Molecular imaging of inflammation in atherosclerosis. *Theranostics.* 2013; 3(11): 865-82.
16. Kato K., Schobr O., Ikeda M. et al. Evaluation and comparison of ^{11}C -choline uptake and calcification in aortic and common carotid arterial walls with combined PET/CT. *Eur. J. Nucl. Mol. Imaging.* 2009; 36(10): 1622-8.
17. Derlin T., Habermann C.R., Lengyel Z. et al. Feasibility of ^{11}C -acetate PET/CT for imaging of fatty acid synthesis in the atherosclerotic vessel wall. *J. Nucl. Med.* 2011; 52(12): 1848-54.

18. Menezes L.J., Kostze C.W., Agu O. et al. Investigating vulnerable atheroma using combined (18)F-FDG PET/CT angiography of carotid plaque with immunohistochemical validation. *J. Nucl. Med.* 2011; 52(11): 1698-703.
19. Stegeman C., Drozdov I., Shalhoub J. et al. Comparative lipidomics profiling of human atherosclerosis plaques. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2011; 4(3): 232-42.
20. Титов В.Н. Интима — биологический сорбционный фильтр. Специфичность патогенов и биологическая классификация воспалительного поражения интимы. *Вестник РАМН.* 2003; 8: 40-3.
21. van Lammeren G.W., Moll F.L., de Borst G.J. Atherosclerotic plaque biomarkers: beyond the horizon of the vulnerable plaque. *Curr. Cardiol. Rev.* 2011; 7: 22-7.
22. Титов В.Н. Теория биологических функций и ее применение при выяснении патогенеза распространенных заболеваний человека. *Успехи совр. биологии.* 2008; 128(5): 435-52.
23. Wyatt J., Nandish S., Oliveros R. et al. Effect of glitazones on the progression of coronary artery disease in type 2 diabetes patients. *Vasc. Health. Risk. Management.* 2010; 6: 1-8.
24. Kwee R.M., Teule G., van Ostenbrugge R.J. et al. Multimodality imaging of carotid artery plaques: 18F-fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography, computed tomography, and magnetic resonance imaging. *Stroke.* 2009; 40: 3718-24.
25. Fagerberg B., Ryndel M., Kjell Dahl J. et al. Differences in lesion severity and cellular composition between *in vivo* assessed upstream and downstream sides of human symptomatic carotid atherosclerotic plaques. *J. Vascular. Res.* 2010; 47: 221-30.
26. Babaev V.R., Fazio S., Gleaves L.A. et al. Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis *in vivo*. *J. Clin. Invest.* 1999; 103(12): 1697-705.
27. Helderma F., Segers D., de Crom R. et al. Effect of shear stress on vascular inflammation and plaque development. *Curr. Opin. Lipidol.* 2007; 18(5): 527-33.
28. Sahebkar A., Watts G.F. New LDL-cholesterol lowering therapies: pharmacology, clinical trials, and relevance to acute coronary syndromes. *Clin. Ther.* 2013; 35(8): 1082-98.
29. Montecucco F., Mach F. New evidences for C-reactive protein (CRP) deposits in the arterial intima as a cardiovascular risk factor. *Clin. Interen. Aging.* 2008; 3(2): 341-9.
30. Schilling J., Lai L., Sambandam N. et al. Toll-like receptor-mediated inflammatory signaling reprograms cardiac energy metabolism by repressing peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 signaling. *Circ. Heart. Fail.* 2011; 4(4): 474-82.
31. Титов В.Н., Осипов С.Г. Атеросклероз. Роль эндогенного воспаления, белков острой фазы и жирных кислот. М.: Изд-во фонда «Клиника XXI века»; 2003.
32. Титов В.Н., Лисицын Д.М. Жирные кислоты. Физическая химия, биология медицина. М. Тверь: ООО «Изд-во Триада»; 2006.
33. Амелюшкина В.А., Уразалина С.Ж., Коткина Т.И. и др. Секреторная фосфолипаза A₂ и перенос липидов липопротеинами у пациентов с риском сердечно-сосудистой патологии (система SCORE) низкой и средней степени. Диагностическое значение теста. *Клин. лаб. диагн.* 2012; 3: 4-10.
34. Luge A., Turu M.M., Rovira N. et al. Early atherosclerotic plaques show evidence of infection by Chlamydia pneum. *Front. Biosci.* 2012; 4: 2423-32.
35. Титов В.Н. Клиническая биохимия жирных кислот, липидов и липопротеинов. М. Тверь: ООО «Изд-во Триада»; 2008.
36. Sala-Vila A., Cofan M., Nunez I. et al. Carotid and femoral plaque burden is inversely associated with the β -linolenic acid proportion of serum phospholipids in Spanish subjects with primary dyslipidemia. *Atherosclerosis.* 2011; 214(1): 209-14.
37. Merchant A.T., Kelemen L.E., de Koning L. et al. Interrelation of saturated fat, trans-fat, alcohol intake, and subclinical atherosclerosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008; 87(1): 168-74.
38. Seo T., Qi K., Chang C. et al. Saturated fat-rich diet enhances selective uptake of LDL cholesterol esters in the arterial wall. *J. Clin. Invest.* 2005; 115(8): 2214-22.
39. Mas S., Martinez-Pina R., Martin-Ventura J.L. et al. Local non-esterified fatty acids correlate with inflammation in atheroma plaques of patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2010; 59: 1292-301.
40. Титов В.Н., Крылин В.В., Ширяева Ю.К. Профилактика атеросклероза. Избыток в пище пальмитиновой кислоты — причина гиперхолестеринемии, синдрома воспаления, резистентности миоцитов к инсулину и апоптоза. *Клин. лаб. диагн.* 2011; 2: 4-15.
41. Sudheendran S., Chang C.C., Deckelbaum R.J. N-3 vs. Saturated fatty acids: effects on the arterial wall. Prostaglandins. Leukot. Essent Fatty. Acids. 2010; 82(4-6): 205-9.
42. Шойбонов Б.Б., Баронец В.Ю., Панченко Л.Ф. и др. Простой способ определения модифицированных липопротеинов низкой плотности. *Патол. физиол. и эксп. терапия.* 2012; 2: 77-83.
43. Судаков Н.П., Никифоров С.Б., Константинов Ю.М. и др. Роль перекисно-модифицированных липопротеидов в механизмах развития митохондриальной дисфункции сосудов при атеросклерозе. *Бюлл. ВШЦ СО РАМН.* 2008; 4(62): 85-9.
44. Кашкин К.П., Дмитриева Л.Н. Белки системы комплемента; свойства и биологическая активность. *Клин. лаб. диагн.* 2000; 7: 25-32.
45. Rossmeisl M., Jilkva M., Kuda O. et al. Metabolic effects of n-3 PUFA as phospholipids are superior to triglycerides in mice fed a high-fat diet: possible role of endocannabinoids. *PLoS One.* 2012; 7(6): e38834. doi: 10.1371/journal.pone.0038834.
46. Mozaffarian D., Wu J.H. (n-3) fatty acids and cardiovascular health: are effects of EPA and DHA shared or complementary? *J. Nutr.* 2012; 142(3): 614-25.
47. Титов В.Н. Первичный и вторичный атеросклероз, атероматоз и атеротромбоз. М. Тверь: ООО «Изд-во Триада»; 2008.
48. Душкин М.И. Макрофаг/пенистая клетка как атрибут воспаления: механизмы образования и функциональная роль. *Биохимия.* 2012; 77(4): 419-32.
49. Fujimoto S., Hartung D., Ohshima S. et al. Molecular imaging of matrix metalloproteinase in atherosclerotic lesions: resolution with dietary modification and statin therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008; 52(3): 1847-57.
50. Cipollone F., Fazio M., Iezzi A. et al. Blockade of the angiotensin II type 1 receptor stabilizes atherosclerotic plaques in humans by inhibiting prostaglandin E₂-dependent matrix metalloproteinase activity. *Circulation.* 2004; 109: 1483-8.
51. Blanco-Colio L.M., Martin-Ventura J.L., Vivanco F. et al. Biology of atherosclerotic plaques: what we are learning from proteomic analysis. *Cardiovasc. Res.* 2006; 72: 18-29.
52. Smith D.D., Tan X., Tawfik O. et al. Increased aortic atherosclerotic plaque development in female apolipoprotein E-null mice is associated with elevated thromboxane A₂ and decreased prostacyclin production. *J. Physiol. Pharmacol.* 2010; 61(3): 309-16.
53. Ouimet M., Marcel Y.L. Regulation of lipid droplet cholesterol efflux from macrophage foam cells. *Arterioscler. Thromb. Vac. Biol.* 2012; 32: 575-81.

54. Zhao Q., eng T., Zhao X. et al. Imaging of atherosclerotic aorta of rabbit model by detection of plaque inflammation with fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography. *Chinese. Med. J.* 2011; 124(6): 911-7.

55. Шевченко О.П., Мишнев О.Д. Ишемическая болезнь сердца. М.; Изд-во «Реафарм». 2005. Тодоров С.С. Гладкие миоциты в патологии сердечно-сосудистой системы. *Росс. кардиол. журнал.* 2009; 5: 91-4.

56. Шелковникова Т.А., Куликова А.А., Цветков Ф.О. и др. Протеинопатии — формы нейродегенеративных заболеваний, в основе которых лежит патологическая агрегация белков. *Мол. биол.* 2012; 46(3): 402-15.

57. Harris W. Omega-3 fatty acids: the «japanese» factor? *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008; 52(6): 425-7.

58. Zampelas A. Eicosapentaenoic acid (EPA) from highly concentrated n-3 fatty acid ethyl esters is incorporated into advanced atherosclerotic plaques and higher plaque EPA is associated with decreased plaque inflammation and increased stability. *Atherosclerosis.* 2010; 212(1): 34-5.

Поступила 18.08.14

References

1. Chazov T.I. History of the study of atherosclerosis: the truth of the hypothesis, speculation. *Terapevticheskiiy arhiv.* 1998; 9: 9-16. (In Russian)

2. Titov V.N. *Filogeneticheskaya teoriya obschey patologii. Patogenez jktpytq zivilizazii. Atherosclerоз.* М.; INFRA-M. 2014. (In Russian)

3. Kuharchuk V.V., Tararak E.M. Atherosclerosis from AL Myasnikov to the present day. *Kardiologicheskiiy vestnik.* 2010; 1: 1-6. (In Russian)

4. Titov V.N. *Atherosclerоз kak patologiya polienovyh girnyh kislot. Biologicheskiiye osnovy teorii aterogeneza.* М.; Fond «Klinika XXI veka». Izdatel'stvo ALTUS. 2002. (In Russian)

5. Titov V.N. *Atherosclerоз kak patologiya polienovyh girnyh kislot. Biologicheskiiye osnovy patogeneza, diagnostiki, profilaktiki I iteheniya aterosclerозa.* М.; Fond «Klinika XXI veka». Izdatel'stvo ALTUS. 2002. (In Russian)

6. Kanjuh V., Ostojic M., Lalic N. et al. Low and high density lipoprotein—cholesterol and coronary atherothrombosis. *Med. Pregl.* 2009. 62; 3: 7-14.

7. Anichkov N.M., Perov I. Virchow 150 years to the study of cellular pathology. *Arkhiv patologii.* 2009; 71(1): 3-8. (In Russian)

8. Johnsen S.H., Mathiesen E.B. Carotid plaque compared with intima-media thickness as a predictor of coronary and cerebrovascular disease. *Curr. Cardiol. Rep.* 2009; 11(1): 21-7.

9. Mahe G., Ronziere T., Laviolle B. et al. An unfavorable dietary pattern is associated with symptomatic ischemic stroke and carotid atherosclerosis. *J. Vasc. Surg.* 2010; 52(1): 62-8.

10. Osipov G.A., Turova E.S. Studying species composition of microbial communities with the use of gas chromatography-mass spectrometry: microbial community of kaolin. *FEMS Microbiol. Rev.* 1997; 20: 437-46.

11. Osipov G.A., Parfenov A.I., Verhovzeva N.V. I drugie. Quantitative analysis of microbiota in situ intestinal wall and faeces by gas chromatography — mass spectrometry. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2004; 9: 67-8. (In Russian)

12. Geer F.C., Panganamala R.V., Cornwell D.G. Position of double bonds in the fatty acids of cholesterol esters from human aorta. *Atherosclerosis.* 1970; 12: 63-74.

13. Ecroos K., Janis M., Tarasov K. et al. Lipidomics: a tool for studies of atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2010; 12: 273-81.

14. Navaravong L., Steenson C., Sigurdsson G. Coronary plaque type and burden by computed tomography angiography without association to C-reactive protein. *N. Am. J. Med. Sci.* 2014; 6(6): 260-5.

15. Wildgruber M., Swirski F.K., Zenecke A. Molecular imaging of inflammation in atherosclerosis. *Theranostics.* 2013; 3(11): 865-82.

16. Kato K, Schobr O., Ikeda M. et al. Evaluation and comparison of ¹¹C-choline uptake and calcification in aortic and common carotid arterial walls with combined PET/CT. *Eur. J. Nucl. Mol. Imaging.* 2009; 36(10): 1622-8.

17. Derlin T., Habermann C.R., Lengyel Z. et al. Feasibility of ¹¹C-acetate PET/CT for imaging of fatty acid synthesis in the atherosclerotic vessel wall. *J. Nucl. Med.* 2011; 52(12): 1848-54.

18. Menezes L.J., Kostze C.W., Agu O. et al. Investigating vulnerable atheroma using combined (18)F-FDG PET/CT angiography of carotid plaque with immunohistochemical validation. *J. Nucl. Med.* 2011; 52(11): 1698-703.

19. Stegeman C., Drozdov I., Shalhoub J. et al. Comparative lipidomics profiling of human atherosclerosis plaques. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2011; 4(3): 232-42.

20. Titov V.N. Quantitative analysis of microbiota in situ intestinal wall and faeces by gas chromatography — mass spectrometry. *Vestnik Rossiyskoy akademii medizinskih nauk.* 2003; 8: 40-3. (In Russian)

21. van Lammeren G.W., Moll F.L., de Borst G.J. Atherosclerotic plaque biomarkers: beyond the horizon of the vulnerable plaque. *Curr. Cardiol. Rev.* 2011; 7: 22-7.

22. Titov V.N. The theory of biological function and its application in elucidating the pathogenesis of common human diseases. *Uspehi sovremennoy biologii.* 2008; 128(5): 435-52. (In Russian)

23. Wyatt J., Nandish S., Oliveros R. et al. Effect of glitazones on the progression of coronary artery disease in type 2 diabetes patients. *Vasc. Health. Risk. Menegement.* 2010; 6: 1-8.

24. Kwee R.M., Teule G., van Ostenbrugge R.J. et al. Multimodality imaging of carotid artery plaques: 18F-fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography, computed tomography, and magnetic resonance imaging. *Stroke.* 2009; 40: 3718-24.

25. Fagerberg B., Ryndel M., Kjell Dahl J. et al. Differences in lesion severity and cellular composition between *in vivo* assessed upstream and downstream sides of human symptomatic carotid atherosclerotic plaques. *J. Vascular. Res.* 2010; 47: 221-30.

26. Babaev V.R., Fazio S., Gleaves L.A. et al. Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis *in vivo.* *J. Clin. Invest.* 1999; 103(12): 1697-705.

27. Helderma F., Segers D., de Crom R. et al. Effect of shear stress on vascular inflammation and plaque development. *Curr. Opin. Lipidol.* 2007; 18(5): 527-33.

28. Sahebkar A., Watts G.F. New LDL-cholesterol lowering therapies: pharmacology, clinical trials, and relevance to acute coronary syndromes. *Clin. Ther.* 2013; 35(8): 1082-98.

29. Montecucco F., Mach F. New evidences for C-reactive protein (CRP) deposits in the arterial intima as a cardiovascular risk factor. *Clin. Interen. Aging.* 2008; 3(2): 341-9.

30. Schilling J., Lai L., Sambandam N. et al. Toll-like receptor-mediated inflammatory signaling reprograms cardiac energy metabolism by repressing peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 signaling. *Circ. Heart. Fail.* 2011; 4(4): 474-82.

31. Titov V.N., Osipov S.G. *Ateroskleroz. Rol' endogennoy vospal'nitsy? Belkov ostroy fazy I girnykh kislot.* М.; Fond «Klinika XXI veka». Izdatel'stvo ALTUS. 2003. (In Russian)
32. Titov V.N., Listyn D.M. *Girnye kisloty. Fizicheskaya himiya, biologiya I meditsina.* М.; Tver': OOO «Izdatel'stvo Triada»; 2006. (In Russian)
33. Ameluschkina V.A., Urazalina S.G., Kotkina T.I. I drugie. Secretory phospholipase A2 and lipid transport of lipoproteins in patients at risk of cardiovascular disease (System SCORE) low to moderate. Diagnostic value of the test. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2012; 3: 4-10. (In Russian)
34. Luge A., Turu M.M., Rovira N. et al. Early atherosclerotic plaques show evidence of infection by Chlamydia pneum. *Front. Biosci.* 2012; 4: 2423-32.
35. Titov V.N. *Klinicheskaya biokhimiya girnykh kislot, lipidov I lipoproteinov.* М.; Tver': OOO «Izdatel'stvo Triada»; 2008. (In Russian)
36. Sala-Vila A., Cofan M., Nunez I. et al. Carotid and femoral plaque burden is inversely associated with the δ -linolenic acid proportion of serum phospholipids in Spanish subjects with primary dyslipidemia. *Atherosclerosis.* 2011; 214(1): 209-14.
37. Merchant A.T., Kelemen L.E., de Koning L. et al. Interrelation of saturated fat, trans-fat, alcohol intake, and subclinical atherosclerosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008; 87(1): 168-74.
38. Seo T., Qi K., Chang C. et al. Saturated fat-rich diet enhances selective uptake of LDL cholesteryl esters in the arterial wall. *J. Clin. Invest.* 2005; 115(8): 2214-22.
39. Mas S., Martinez-Pina R., Martin-Ventura J.L. et al. Local non-esterified fatty acids correlate with inflammation in atheroma plaques of patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2010; 59: 1292-301.
40. Titov V.N., Krylin V.V., Schiryayeva Yu.K. Prevention of atherosclerosis. Excess dietary palmitic acids — cause hypercholesterolemia syndrome inflammation, insulin resistance and myocyte apoptosis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2011; 2: 4-15. (In Russian)
41. Sudheendran S., Chang C.C., Deckelbaum R.J. N-3 vs. Saturated fatty acids: effects on the arterial wall. Prostaglandins. Leukot. Essent Fatty. *Acids.* 2010; 82(4-6): 205-9.
42. Schoybonov B.B., Baronez V.Yu., Panchenko L.F. I drugie. A simple method of determining the modified low-density lipoprotein. *Patologicheskaya fiziologiya I eksperimental'naya terapiya.* 2012; 2: 77-83. (In Russian)
43. Sudakov N.P., Nikiforov S.B., Konstantinov Yu.M. I drugie. The role of the peroxide-modified lipoproteins in the mechanisms of mitochondrial dysfunction in atherosclerosis vessels. *Bulliten' VSNZ SO RAMN.* 2008; 4(62): 85-9. (In Russian)
44. Kaschkin K.P., Dmitrieva L.N. The role of the peroxide-modified lipoproteins in the mechanisms of mitochondrial dysfunction in atherosclerosis vessels. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2000; 7: 25-32. (In Russian)
45. Rossmesl M., Jilkva M., Kuda O. et al. Metabolic effects of n-3 PUFA as phospholipids are superior to triglycerides in mice fed a high-fat diet: possible role of endocannabinoids. *PLoS One.* 2012; 7(6): e38834. doi: 10.1371/journal.pone.0038834.
46. Mozaffarian D., Wu J.H. (n-3) fatty acids and cardiovascular health: are effects of EPA and DHA shared or complementary? *J. Nutr.* 2012; 142(3): 614-25.
47. Titov V.N. *Pervichniy i vtorichniy ateroskleroz, ateroskleroz I ateroskleroz.* М. Tver': OOO «Izdatel'stvo Triada». 2008. (In Russian)
48. Duschkin M.I. Macrophage/foam cells as an attribute of inflammation: mechanisms of formation and functional role. *Biokhimiya.* 2012; 77(4): 419-32. (In Russian)
49. Fujimoto S., Hartung D., Ohshima S. et al. Molecular imaging of matrix metalloproteinase in atherosclerotic lesions: resolution with dietary modification and statin therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008; 52(3):1847-57.
50. Cipollone F., Fazia M., Iezzi A. et al. Blockade of the angiotensin II type 1 receptor stabilizes atherosclerotic plaques in humans by inhibiting prostaglandin E2-dependent matrix metalloproteinase activity. *Circulation.* 2004; 109: 1483-8.
51. Blanco-Colio L.M., Martin-Ventura J.L., Vivanco F. et al. Biology of atherosclerotic plaques: what we are learning from proteomic analysis. *Cardiovasc. Res.* 2006; 72: 18-29.
52. Smith D.D., Tan X., Tawfik O. et al. Increased aortic atherosclerotic plaque development in female apolipoprotein E-null mice is associated with elevated thromboxane A2 and decreased prostacyclin production. *J. Physiol. Pharmacol.* 2010; 61(3): 309-16.
53. Ouimet M., Marcel Y.L. Regulation of lipid droplet cholesterol efflux from macrophage foam cells. *Arterioscler. Thromb. Vac. Biol.* 2012; 32: 575-81.
54. Zhao Q., eng T., Zhao X. et al. Imaging of atherosclerotic aorta of rabbit model by detection of plaque inflammation with fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography. *Chinese. Med. J.* 2011; 124(6): 911-7.
55. Schevchenko O.P., Mischnev O.D. *Ischemicheskaya bolezn' serdca.* М.: Izdatel'stvo «Reafarm»; 2005. (In Russian)
56. Todorov S.S. Smooth muscle cells in diseases of the cardiovascular system. *Rossiyskiy kardiologicheskiy gurnal.* 2009; 5: 91 — 4. (In Russian)
57. Schelkovnikova T.A., Kulikova A.A., Zvetkov F.O. i drugie. Proteopathy — forms of neurodegenerative diseases which are based on the aggregation of abnormal proteins. *Molekulyarnaya biologiya.* 2012; 46(3): 402 — 15. (In Russian)
58. Harris W. Omega-3 fatty acids: the «japanese» factor? *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008; 52(6): 425-7.
59. Zampelas A. Eicosapentaenoic acid (EPA) from highly concentrated n-3 fatty acid ethyl esters is incorporated into advanced atherosclerotic plaques and higher plaque EPA is associated with decreased plaque inflammation and increased stability. *Atherosclerosis.* 2010; 212(1): 34-5.

Received 18.08.14

Сведения об авторах:

Осипов Георгий Андреевич, доктор биол. наук, ст. науч. сотр. отдела лабораторной диагностики НИИ скорой помощи им А.В. Склифосовского, e-mail: osipov@raexpert.ru

Тарарак Эдуард Михайлович, доктор мед. наук, проф., руководитель лаборатории патоморфологии атеросклероза Института экспериментальной кардиологии ФБГУ РКНПК Минздрава России, e-mail: etarak@mail.ru

Годков Михаил Андреевич, доктор мед. наук, проф., руководитель отдела лабораторной диагностики ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, e-mail: mgodkov@yandex.ru

Панченко Л.Ф.^{1,2}, Терехина Н.Н.¹, Пирожков С.В.³, Наумова Т.А.¹,
Баронец В.Ю.¹, Балашова А.А.⁴, Гармаш И.В.⁴

Сывороточные маркеры фиброза и эндотелиальной дисфункции у больных алкоголизмом с различной степенью фиброза печени

- ¹ — ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России, 119991, Москва, Кропоткинский пер., д. 23
- ² — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАН, 125315, Москва, Балтийская улица, д. 8
- ³ — ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
- ⁴ — Медицинский институт ФГАОУ ВО «Российского университета дружбы народов», 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

В сыворотке крови больных алкоголизмом с разной степенью выраженности фиброза печени исследовано содержание маркеров фиброза, эндотелиальной дисфункции и цитокинов, регулирующих воспаление. Концентрация в крови индикаторов фиброгенеза — коллагена 4 типа, гиалуроновой кислоты, TIMP-1, TIMP-2, YKL-40 и MMP-2 значительно возросла при фиброзе 4-й степени и умеренно при более низкой и нулевой степенях фиброза печени. Аналогичные данные получены в отношении провоспалительных цитокинов IL-6, IL-8, IL-12/ρ70 и IL-12/ρ40. Величина эндотелиальной дисфункции, определенная на основании данных о содержании в крови ее маркеров — VEGF-A, MCP-1, s-VCAM, s-ICAM и эндотелина, максимальна при фиброзе 4-й степени и менее выражена при фиброзе низких степеней. Установлены корреляции средней степени между показателями фиброза, эндотелиальной дисфункции и содержанием в крови провоспалительных цитокинов. Сделан вывод о тесном взаимодействии между иммунными клетками, выделяющими стимуляторы воспаления и фиброгенеза, перисинусоидальными липоцитами, вырабатывающими коллаген, и эндотелием, секретирующим вазоконстрикторы, в патогенезе алкогольного фиброза и цирроза печени.

Ключевые слова: фиброз; эндотелиальная дисфункция; цитокины; алкоголизм

Panchenko L.F.^{1,2}, Terebilina N.N.¹, Pyrozhkov S.V.³, Naumova T.A.¹,
Baronets V.Y.¹, Balashova A.A.⁴, Garmash I.V.⁴

Serum markers of fibrosis and endothelial dysfunction in patients with alcoholism, with varying degrees of liver fibrosis

- ¹ — Federal State Budgetary Institution «V.Serbysky Federal Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 119991, Moscow, Kropotkinskiy per., 23
- ² — Federal State Budgetary Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology» 125315, Moscow, the Baltijskaja str., 8
- ³ — The State Education Institution of Higher Professional Training «The First Sechenov Moscow State Medical University» under Ministry of Health of the Russian Federation, 119991, Moscow, Trubetskaya str., 8, p. 2
- ⁴ — Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Peoples' Friendship University of Russia» 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 6

In the serum of patients with alcoholism with varying degrees of severity of liver fibrosis were studied the content markers of fibrosis, endothelial dysfunction and proinflammatory cytokines. Concentration in blood indicators of fibrogenesis — collagen type 4, hyaluronic acid, TIMP-1, TIMP-2, YKL-40 and MMP-2 is considerably increased at the 4 degree of fibrosis and moderately increased at low and zero degrees of liver fibrosis. Similar results were obtained in respect of proinflammatory cytokines IL-6, IL-8, IL-12 / ρ70 and IL-12 / ρ40. The magnitude of endothelial dysfunction, calculated based on its content in the blood markers — VEGF-A, MCP-1, s-VCAM, s-ICAM and endothelin, was maximal at 4 degrees of fibrosis and less pronounced at low degrees of fibrosis. Correlations between of the average degree of fibrosis, endothelial dysfunction, and blood levels of proinflammatory cytokines were installed. Close relation between the immune cells releasing stimulators of inflammation and fibrogenesis, perisinusoidal fat cells producing collagen, and endothelium secreting vasoconstrictors in the pathogenesis of alcoholic liver fibrosis and cirrhosis was installed.

Key words: fibrosis; endothelial dysfunction; cytokines; alcoholism

Для корреспонденции: Терехина Наталья Николаевна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. биохимии ФГБУ ФМИЦПН им. В.П. Сербского Минздрава России

Фиброз — это форма нарушения тканевого роста, характерная для всех хронических заболеваний печени, связанных с повреждением гепатоцитов. Фиброз часто переходит в цирроз печени, который не поддается ремиссии при лечении стандартными терапевтическими средствами.

Согласно современной концепции патогенеза фиброза [1], из поврежденных гепатоцитов выделяются цитокины (TGF β , INF α , EGF), которые активируют купферовские клетки и привлекают Т-лимфоциты в зону альтерации. Кроме того, активированные купферовские клетки, Т-лимфоциты и поврежденные гепатоциты секретируют цитокины, усиливающие воспаление (TNF α , INF α , IL-6), активные радикалы кислорода и ростовые факторы (PDGF, CTGF). Все указанные биологически активные вещества способствуют активации перисинусоидальных липоцитов (ПСЛ), их пролиферации и превращению в миофибробласты. При этом в межклеточном веществе снижается содержание ламинина и коллагена типа IV, но возрастает доля фибриллярных коллагенов типа I и III.

Фиброз печени характеризуется избыточным накоплением компонентов межклеточного матрикса из-за дисбаланса между скоростью их синтеза и деградации. На конечных стадиях фиброза в печени содержится примерно в 6 раз больше компонентов матрикса, чем в норме, включая коллагены типа I, III и IV, фибронектин, ундулин, эластин, ламинин, гиалуронан и протеогликаны [2]. Деградацию компонентов матрикса осуществляют матриксные металлопротеиназы (ММП). Активированные ПСЛ вырабатывают повышенное количество ММП-2, ММП-9 и ММП-3, что способствует разрушению базальной мембраны и миграции клеток воспаления. Установлена корреляция между величиной фиброза печени и активностью в крови ММП-2 и ММП-9 [3]. Кроме того, после активации ПСЛ усиленно синтезируют и тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ (ТИМР). Сообщалось, что содержание в крови ТИМР-1 и ММП-2 надежно предсказывает наличие цирроза печени у больных хроническим гепатитом С с чувствительностью 100% и специфичностью 56—75% [4].

Процептиды и зрелые молекулы коллагена типа I и III, ММП, ТИМР, а также цитокины, выделяемые активированными ПСЛ и Т-лимфоцитами, могут служить маркерами активного синтеза и деградации компонентов межклеточного матрикса в ткани печени, то есть фиброза.

Коллаген IV типа рассматривают как маркер образования базальной мембраны капилляров и капилляризации синусоидов печени при фиброзе. Содержание в сыворотке крови коллагена IV типа повышено у бо-

льных алкогольной болезнью печени (АБП) [5]. Еще один компонент межклеточного матрикса, свидетельствующий о фиброзе печени, — гиалуриновая кислота (ГК). Этот высокомолекулярный глюкозаминогликан попадает в общий кровоток из лимфатической системы. Содержание в крови ГК повышается при фиброзе печени и коррелирует с активностью воспалительного процесса и стадиями фиброза у больных АБП [6]. В другом исследовании концентрация ГК в крови меньше 60 мкг/л исключала диагноз цирроза печени, а концентрация более 110 мкг/л — его предсказывала со специфичностью 78% [7].

УКЛ-40, хрящевой гликопротеин с молекулярной массой 39 килодальтон, является гомологом бактериальных хитиназ. Предполагается, что этот фактор может участвовать в ремоделировании межклеточного матрикса, а также служить ростовым фактором для соединительной ткани и эндотелиальных клеток. Содержание УКЛ-40 в плазме крови коррелирует с выраженностью фиброза у больных АБП [8].

Прогрессирование фиброза связано с усилением синтеза и секреции цитокинов. Поэтому некоторые из них могут быть потенциальными маркерами фиброза. TGF β является основным стимулятором синтеза компонентов межклеточного вещества перисинусоидальными липоцитами. Концентрация в крови TGF β коррелирует с наличием фиброза печени у больных АБП [9]. Вместе с тем, TGF β относящийся к медиаторам воспаления, выделяется в зоне некроза, и его содержание в крови коррелирует с активностью трансаминаз АЛТ и АСТ [10]. Таким образом, TGF β скорее маркер некроза, чем фиброза печени.

Ремоделирование ткани печени в процессе фиброза и цирроза сопровождается портальной гипертензией, в основе которой лежит нарастающее сопротивление внутрипеченочному току крови. Значительная часть этого сопротивления связана с механическими факторами, но имеется также и обратимая динамическая составляющая, опосредованная сокращением клеточных элементов самой стенки сосудов и их окружения. На долю динамического компонента приходится до 30—40% от общего внутрипеченочного сосудистого сопротивления при циррозе [11]. Сократимые элементы, влияющие на внутрипеченочное сосудистое ложе, включают гладкомышечные клетки стенки мелких венул, активированные ПСЛ, отростки которых окружают синусоиды, и миофибробласты, способные сдавливать узлы-регенераты и венозные шунты в фиброзных септах. В норме клетки эндотелия выделяют вазодилататоры в ответ на повышение объема крови и давления на стенки сосуда. Однако, при эндотелиальной дисфункции эндотелий-зависимая вазодилатация оказывается недостаточной.

Внутри- и внепеченочная дисфункция эндотелия является важным фактором, который вызывает и усугубляет портальную гипертензию. Снижение активности эндотелиальных клеток способствует повышению сопротивления микроциркуляторного русла за счет уменьшения выработки оксида азота. Кроме того, диаметр микрососудов печени может уменьшаться при сокращении активированных ПСЛ и вследствие накопления массы межклеточного вещества при фиброзе. Напротив, с развитием портальной гипертензии повышается активность эндотелия в сосудах висцеральной и системной циркуляции, усиливается выделение NO, что приводит к артериальной гиперемии и возрастанию коллатерального кровотока, то есть повышенному притоку крови в воротную вену [12]. Таким образом, по мере развития АБП, портальная гипертензия начинает нарастать по типу «порочного круга».

Под влиянием различных факторов, включающих эндотоксин, вирусы, лекарства и этанол, в эндотелиальных клетках синусоидов печени возникает окислительный стресс [13]. В результате стимулируется клеточный воспалительный ответ, реализуемый через TLR4/MyD88 сигнальные пути [12], что приводит к дисфункции эндотелия. Злоупотребление алкоголем способствует воспалительному процессу в организме, так как при этом в кровь портальной системы через стенку кишечника усиленно проникают эндотоксины [14], которые активируют купферовские клетки посредством LPS/Toll-подобного-4 рецептора. В настоящее время предполагают, что развитие АБП связано с иммунным дисбалансом и гиперпродукцией цитокинов и хемокинов [15, 16].

Цель исследования — выяснить связь между образованием цитокинов, интенсивностью воспалительного процесса у больных АБП и величиной фиброгенеза в ткани печени, который проявляется увеличением содержания его маркеров в крови.

Методика

В исследовании участвовали 124 больных алкоголизмом, проходивших лечение в 64-й ГКБ г.Москвы. Из исследования исключали пациентов с серопозитивной реакцией на антитела к вирусам гепатита и страдающих хроническими заболеваниями печени неалкогольной этиологии. Эластометрическое исследование пациентов проводили на аппарате «Фиброскан» (FibroScan) (Франция).

Биохимические показатели (аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, гаммаглутамилтранспептидаза, лактатдегидрогеназа, щелочная фосфатаза, амилаза, холинэстераза, билирубин общий и прямой, мочевины, креатинин, холестерин, общий белок,

альбумин, глюкоза) определялись коммерческими наборами фирмы DiaSys (Германия) на биохимическом анализаторе «HUMALYZER Junior» (Германия).

IL-6, IL-8, TGF- β 1, VEGF-A, MCP-1, s-VCAM, s-ICAM-1, MMP-2 определялись наборами BenderMedSystem (Австрия); IL-12p40 и IL-12p70 — наборами фирмы BioSource (Бельгия); TIMP-1 и TIMP-2 — наборами R&B Systems (США); YKL-40 — набором Quidel Corporation (США); эндотелин — набором Biomedica Medizinprodukte (Австрия); гиалуроновая кислота — набором Corgenix (США); коллаген IV типа — набором Argutus Medical (производства Японии).

Корреляционный анализ результатов проведен с помощью пакета статистических программ Excel 2003.

Результаты и обсуждение

Пациенты, страдающие АБП, на основании результатов эластометрии печени были разделены на три группы. Первая группа соответствовала нулевой степени фиброза со средним значением давления деформации (СЗДД) 4,2 кПа, вторая группа включала пациентов со степенью фиброза 1-3 и СЗДД 7,9 кПа; в третьей группе объединили пациентов с 4-й степенью фиброза и циррозом печени (СЗДД — 43,1 кПа). Как видно из табл. 1, средний период злоупотребления алкоголем достоверно не различался в трех группах пациентов с АБП, составляя от 12 до 15 лет.

Определение сывороточных маркеров фиброза в исследуемых группах пациентов демонстрирует их различную диагностическую ценность. Содержание коллагена IV типа незначительно возрастает при степени фиброзе менее 3, но увеличивается более чем в 4 раза у пациентов со степенью 4 алкогольного фиброза (табл. 1). Аналогичная картина наблюдается в отношении гиалуроновой кислоты. Однако в этом случае, при фиброзе максимальной выраженности, концентрация гиалуроната в крови возрастает более чем в 10 раз.

Коллаген IV типа рассматривают как маркер образования базальной мембраны и капилляризации синусоидов при фиброзе. Сообщалось о повышенной концентрации в крови коллагена IV типа при АБП и гепатоцеллюлярной карциноме [17], а также у пациентов с диссеминированным раком желудка [18]. Таким образом, этот показатель не является специфичным для фиброза при АБП, но сигнализирует о высокой интенсивности процесса. На содержание в крови гиалуроновой кислоты влияют различные факторы: состояние эндотелия сосудов печени, трансформация ПСЛ в миофибробласты, которые выделяют компо-

ненты межклеточного матрикса (включая и ГК), давление крови в воротной вене, степень капилляризации синусоидов и др. Изучение параметров функции печени и маркеров фиброза в крови у 208 пациентов с хроническим гепатитом В показало, что из 21 показателя самая высокая корреляция со степенью фиброза печени была у ГК ($r = 0,456$) [19]. У пациентов с АБП концентрация в крови ГК также коррелировала со стадиями фиброза печени [6]. В настоящем исследовании ГК существенно возрастала только при высокой степени фиброза, переходящей в цирроз.

Содержание в крови ингибитора металлопротеиназы TIMP-1 возрастало в 4 раза уже при нулевой степени фиброза у злоупотребляющих алкоголем. В ходе дальнейшего развития фиброза печени прирост TIMP-1 в крови был относительно небольшим. Только при 4-й степени фиброза возрастание концентрации TIMP-1 было достоверно выше на 36% по сравнению с нулевой стадией. При этом концентрация TIMP-2 в крови не выходила за пределы нормы при степени фиброза от 0 до 3. У пациентов 4-й степени фиброза содержание TIMP-2 было достоверно выше на 61% по сравнению с нулевой степенью, однако оставалось в пределах нормальных значений. Сообщалось, что содержание в крови TIMP-1 выше у пациентов с фиброзом и циррозом печени по сравнению с группой, у которых АБП ограничивалась стеатозом [20]. Полученные нами результаты говорят о том, что содержание в крови TIMP существен-

но возрастает только при высокой степени фиброза и не является чувствительным показателем интенсивности этого патологического процесса. Аналогичный вывод можно сделать, оценивая содержание в крови металлопротеиназы MMP-2. Концентрация этого фермента существенно возросла только при 4-й степени фиброза, по сравнению с нулевой, и незначительно превышала верхнюю границу нормы.

Индекс АСТ/тромбоциты предложили как простой и доступный индикатор фиброза печени. Значения этого показателя увеличиваются при нарастании портальной гипертензии и снижении концентрации тромбоцитов в крови. При мета-анализе 18 исследований, в которых определяли индекс АСТ/тромбоциты у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С, установили, что его специфичность для диагностики цирроза печени составляет 94%, а чувствительность — 48% [21]. При других нозологических формах применимость индекса АСТ/тромбоциты остается под вопросом. Нами установлено, что существенное увеличение индекса АСТ/тромбоциты происходит только при алкогольном фиброзе печени 4-й степени (табл. 1).

Концентрация в крови гликопротеина YKL-40 возрастает в 2,5 раза при нулевой степени фиброза у пациентов, злоупотребляющих алкоголем, и сохраняет тенденцию к дальнейшему росту при 1-3 степенях этого процесса (табл. 1). Значительное повышение в крови YKL-40 (примерно в 5 раз) наблюдается

Таблица 1

Показатели фиброза у больных алкоголизмом с различной степенью фиброза печени

Показатели	Норма	Степень фиброза F		
		0 (45 чел.)	1–3 (28 чел.)	4 (51 чел.)
Срок употребления алкоголя (лет)	—	12,1 ± 1,77	14,2 ± 2	15 ± 0,58
E_med. (кПа)	До 5,8 кПа — F0 5,8–7,2 кПа — F1 7,3–9,5 кПа — F2 9,6–12,5 кПа — F3 >12,6 — F4	4,2 ± 0,19	7,9 ± 0,55	43,1 ± 3,6
Коллаген IV типа	99 ± 23 мкг/л	105,8 ± 6,3	131 ± 12	456 ± 65*** ааа
Гиалуроновая кислота (ГК)	28,5 ± 24 нг/мл	33,6 ± 6,6	38 ± 9,9	493 ± 57*** ааа
TIMP-1	172 ± 130 нг/мл	773 ± 49***	840 ± 42***	1052 ± 44*** ааа
TIMP-2	175 ± 75 нг/мл	136,4 ± 7	142 ± 16	219 ± 12,2 ааа
YKL-40	43 ± 15 нг/мл	102,7 ± 12,5**	123 ± 15***	210 ± 10,8*** ааа
MMP-2	231 ± 70 нг/мл	196,5 ± 9,7	209 ± 8,8	344 ± 15,2 ааа
Индекс АСТ/тромбоциты	—	0,39 ± 0,08	0,51 ± 0,07	1,04 ± 0,10 ааа

Примечание. E_med. (кПа) — эластичность (плотность) печени по данным эластографии; TGF- β 1 — трансформирующий фактор роста- β 1; TIMP-1, TIMP-2 — тканевой ингибитор металлопротеиназы -1 и 2 соответственно; YKL-40 — хрящевой гликопротеин; MMP-2 — металлопротеиназа-2.

Индекс АСТ/тромбоциты рассчитывали по формуле: (активность АСТ/верхний предел нормальной активности АСТ) x 100/содержание тромбоцитов (тыс./мл).

***, **, * — достоверность различия по сравнению с нормой, $p < 0,001$, $p < 0,01$ и $p < 0,05$ соответственно; ааа, аа, а — достоверность различия по сравнению со стадией фиброза F0, $p < 0,001$, $p < 0,01$ и $p < 0,05$ соответственно.

у пациентов с фиброзом печени 4-й степени. Таким образом, γ -ГЛТ-40 представляется наиболее удачным из использованных нами маркеров алкогольного фиброза, как по диапазону сдвига, так и по последовательности возрастания концентрации по мере прогрессирования патологических изменений в ткани печени. Коэффициент корреляции между концентрацией γ -ГЛТ-40 в крови и показателем эластичности печени ($E_{med.}$), отражающем степень фиброза печени, составил 0,53 ($p \leq 0,01$).

Табл. 2 демонстрирует, что существенное снижение функции печени имеет место только при фиброзе 4-й степени. На этой стадии АБП у пациентов в сыворотке крови уменьшалась активность холинэстеразы и концентрация альбумина, в 2 раза и на 20%, соответственно, по сравнению с пациентами с нулевой степенью фиброза. Кроме того, достоверно увеличивалось значение МНО, что говорит о дефиците факторов коагуляции, вырабатываемых печенью. При высокой степени фиброза появлялись признаки холестаза в виде значительного повышения сывороточной активности ГГТП и существенного возрастания концентрации билирубина, в основном за счет конъюгированной фракции. При этом сывороточная актив-

ность АЛТ изменялась незначительно, а активность АСТ заметно возрастала, что привело к повышению среднего отношения АСТ/АЛТ до 1,9 по сравнению с величиной примерно 1,0 у пациентов с более низкой степенью фиброза. Известно, что при многих острых и хронических заболеваниях печени отношение АСТ/АЛТ меньше или равно 1, а при алкогольном гепатите часто превышает 2 [22]. Другие биохимические показатели, а также концентрация тромбоцитов в крови, существенно не изменялись у обследованных пациентов с алкогольным фиброзом печени.

Злоупотребление алкоголем вызывает активацию купферовских клеток. Последние, в свою очередь, выделяют множество различных медиаторов. Часть из них усиливает воспалительный процесс ($TNF\alpha$, $IL-1$, $IL-8$). Другие, наоборот, подавляют воспаление и стимулируют фиброгенез ($TGF\beta$) [23]. В табл. 3 приведены результаты определения в крови цитокинов про- и противовоспалительного профиля у пациентов с разной степенью алкогольного фиброза печени. Обращает на себя внимание значительное накопление в крови $IL-8$, содержание которого возрастает в 4 раза при фиброзе 4-й степени по сравнению со случаями менее выраженных изменений ткани или отсутствия фиброза.

Таблица 2

Биохимические и коагулометрические показатели крови у больных алкоголизмом с различной степенью фиброза печени

Показатели	Норма	Степень фиброза F		
		0 (45 чел.)	1–3 (28 чел.)	4 (51 чел.)
Срок употребления алкоголя (лет)	—	12,1 ± 1,77	14,2 ± 2	15 ± 0,58
Аланинаминотрансфераза (АЛТ)	0–38 Е/л	34,4 ± 5,9	37,7 ± 7,3	39,3 ± 4,7
Аспаратаминотрансфераза (АСТ)	0–38 Е/л	38 ± 6,9	39,5 ± 7,4	74,5 ± 10**, ^{aa}
γ -Глутамилтранспептидаза (ГГТП)	0–50 Е/л	125 ± 40*	121,2 ± 28*	270 ± 59**, ^a
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ)	225–480 Е/л	286 ± 46	225 ± 15	255 ± 23
Щелочная фосфатаза (ЩФ)	0–645 Е/л	96,4 ± 14	66,6 ± 7,6	183 ± 30,8
Билирубин общий	3–21 мкмоль/л	13 ± 1,4	20,2 ± 4,8	68,3 ± 18,1**, ^{aa}
Билирубин прямой	0–3,43 мкмоль/л	3,2 ± 0,38	4,5 ± 0,83	32,6 ± 10,5*, ^a
Мочевина	2,8–7,2 ммоль/л	4,5 ± 0,7	7,68 ± 1,9	5,63 ± 0,64
Креатинин	59–104 мкмоль/л	83,5 ± 3,7	94,9 ± 12	88,6 ± 7,9
Холестерин	3,1–5,2 ммоль/л	5,33 ± 0,35	4,58 ± 0,5	4,97 ± 0,36
Общий белок	66–83 г/л	69,9 ± 1,43	72,5 ± 4,2	72,3 ± 1,6
Альбумин	35–53 г/л	42,3 ± 2	42,3 ± 3,4	33,6 ± 1,9 ^a
Холинэстераза	65–190 мккат/л	128 ± 9,9	87,2 ± 12	64,8 ± 6,8 ^{aaa}
СОЭ	1–10 мм/ч	27 ± 9,6	17,8 ± 7,4	29 ± 3,8
Тромбоциты	140–440 тыс./мкл	256 ± 45	205 ± 16	189 ± 18,3
Протромбиновый индекс (ПИ)	70–120	108,8 ± 8,2	89,7 ± 12,5	70,2 ± 5
Международное нормализованное отношение (МНО)	0,95–1,15	0,94 ± 0,05	1,04 ± 0,09	1,32 ± 0,048*, ^a

Примечание. ***, **, * — достоверность различия по сравнению с нормой, $p < 0,001$, $p < 0,01$ и $p < 0,05$ соответственно; ^{aaa}, ^{aa}, ^a — достоверность различия по сравнению со стадией фиброза F0, $p < 0,001$, $p < 0,01$ и $p < 0,05$ соответственно.

IL-8 приписывают важную роль в мобилизации нейтрофилов из костного мозга и в последующей инфильтрации ими ткани в ответ на повреждение клеток. Секретию IL-8 стимулируют TNF α и лиганды Toll-подобного рецептора. Сообщалось, что концентрация IL-8 возрастает значительно при алкогольном гепатите и умеренно при алкогольном циррозе [24]. В настоящем исследовании и более ранней работе [16] получены противоположные результаты: при фиброзе 4-й степени и циррозе печени концентрация в крови IL-8 многократно превышает значения при алкогольном гепатите или низкой степени фиброза.

IL-12 является одним из ключевых регуляторов иммунных реакций при воспалительном ответе. Биологически активный IL-12 (IL-12 /p70) — гетеродимер, состоящий из двух субъединиц: p35 и p40. Субъединица p35 постоянно экспрессируется многими клетками, а синтез p40 стимулируется в моноцитах и макрофагах под действием инфекционных агентов и продуктов бактерий, таких как эндотоксин [25].

IL-12 индуцирует ответ Th1-зависимого типа и регулирует клеточно-опосредованный иммунитет. Активация и пролиферация цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов под действием IL-12 может способствовать разрушению гепатоцитов, благодаря узнаванию на их поверхности неоантигенов, в частности продуктов ковалентного присоединения ацетальдегида к молекулам белков (аддуктов), ко-экспрессируемых вместе с молекулами HLA I класса [26].

Содержание в крови активной формы воспалительного цитокина IL-12/p70 незначительно увеличивалось при злоупотреблении алкоголем и слабой выраженности фиброза печени. У пациентов с 4-й степенью фиброза этот показатель достоверно возрос в 1,5 раза по сравнению с пациентами с нулевой степенью фиброза (табл. 3). Концентрация субъединицы IL-12/p40 последовательно увеличивалась в 2,3, 2,6 и 3,4 раза по сравнению с нормой в группах, соответственно, с нулевой, 1-3 и 4-й степе-

ню фиброза. Однако средние величины IL-12/p40 между группами достоверно не различались.

IL-6 оказывает неоднозначное влияние на течение АБП. Этот цитокин — один из основных медиаторов острофазного воспалительного ответа. IL-6 способствует дифференциации Th17-лимфоцитов человека и секреции ими IL-17 [24], что служит одним из факторов развития алкогольного гепатита. С другой стороны, получены данные о гепатопротекторном эффекте IL-6, опосредованном активацией фактора транскрипции STAT3 [27].

Содержание IL-6 в крови незначительно у пациентов с невыраженным фиброзом, но увеличивается на порядок при фиброзе 4-й степени (табл. 3). Связано ли это увеличение с активацией механизмов, направленных на ограничение фиброгенеза и апоптоза гепатоцитов, предстоит выяснить.

Следует отметить, что концентрация профиброгенного фактора TGF- β ₁ увеличена в 5 раз у пациентов с нулевой и начальными степенями фиброза, а при значительной выраженности этого процесса несколько снижается (табл. 3). Этот цитокин, выделяемый макрофагами, способствует фиброзу за счет непосредственной стимуляции резидентных мезенхимальных клеток и превращения их в коллаген-синтезирующие миофибробласты [28].

Таким образом, наибольшая интенсивность воспалительного процесса проявляется у пациентов с высокой степенью фиброза печени, о чем свидетельствует значительное (в ряде случаев многократное) увеличение концентрации в крови провоспалительных цитокинов IL-8, IL-12, IL-6, а также СОЭ, по сравнению с нормой и пациентами с низкой степенью фиброза. Между интенсивностью фиброза у обследованных нами пациентов и концентрацией в крови IL-8 ($r = 0,48$) и IL-6 ($r = 0,43$) имеется корреляция, свидетельствующая о причастности этих цитокинов к повреждению гепатоцитов и фиброгенезу в ткани печени.

Таблица 3

Содержание цитокинов в крови пациентов с различной степенью фиброза печени

Показатели	Норма	Степень фиброза F		
		0 (45 чел.)	1–3 (28 чел.)	4 (51 чел.)
IL-6	0,5 ± 0,2 пг/мл	0,17 ± 0,1	1,58 ± 0,99	10,5 ± 2,9 ааа
IL-8	0,4 ± 0,3 пг/мл	12,1 ± 1,77	12,6 ± 2,4	43,6 ± 12,8**,а
IL-12/p70	74,9 ± 28,9 пг/мл	94,4 ± 12	127 ± 33	147,3 ± 16,2*,а
IL-12/p40	38 ± 21 пг/мл	88,6 ± 11,5*	100,6 ± 12*	129,8 ± 18,5**
TGF- β ₁	8,25 ± 2,2 нг/мл	40,5 ± 5,1***	39,4 ± 3,1***	28 ± 1,66***,а

Примечание. ***, **, * — достоверность различия по сравнению с нормой, $p < 0,001$, $p < 0,01$ и $p < 0,05$ соответственно; ааа, аа, а — достоверность различия по сравнению со стадией фиброза F0, $p < 0,001$, $p < 0,01$ и $p < 0,05$ соответственно.

В табл. 4 представлены показатели, характеризующие дисфункцию эндотелия, у пациентов с алкогольным фиброзом печени. Эндотелиальной дисфункцией принято считать дисбаланс в образовании медиаторов, которые регулируют тонус сосудов, агрегацию тромбоцитов, реакции коагуляции белков плазмы крови и фибринолиз. Видно, что при злоупотреблении алкоголем содержание в крови рогового фактора сосудистого эндотелия (VEGF-A) увеличивается в 19-25 раз и незначительно варьирует в зависимости от наличия и степени фиброза печени. В эксперименте показано, что VEGF-A играет важную роль в развитии цирроза печени на фоне воспалительного процесса. VEGF-A, выделяемый клетками воспаления, повышает проницаемость стенки микрососудов и способствует выходу белков плазмы и иммунных клеток в перисинусоидальное пространство [12].

Моноцитарный хемоаттрактантный протеин 1 (MCP-1) принадлежит семейству CC хемокинов (β -хемокинов). Кроме способности привлекать моноциты, эозинофилы и лимфоциты в очаг воспаления, MCP-1 регулирует экспрессию адгезивных молекул и выделение воспалительных цитокинов — $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ и $IL-6$. Роль MCP-1 в патогенезе АБП следует из данных о повышении его концентрации в крови пациентов с алкогольным гепатитом [29], в отличие от других CC-хемокинов (MIP-1 α и MIP-1 β), содержание которых не изменялось.

Растворимые формы сосудистых адгезивных молекул s-VCAM-1 и s-ICAM-1 считают надежными маркерами повреждения эндотелия. Нами установлено, что концентрация в крови s-VCAM-1 мало изменяется при отсутствии у пациентов признаков фиброза, достоверно возрастает на 30% при фиброзе 1—3 степени и существенно (в 4 раза) увеличивается у пациентов с фиброзом 4-й степени (табл. 4). Содержание s-ICAM-1 не отличалось от нормы у пациентов без фиброза или при низкой степени его выраженности, но достоверно увеличивалось в 2,8 раза в случае фиброза 4-й степени (по

сравнению с нулевой). В нормальной печени молекула s-ICAM-1 слабо проявляется на поверхности эндотелия синусоидов. Такой характер экспрессии s-ICAM-1 сохраняется и при алкогольном стеатозе без выраженного воспаления [30]. Развитие алкогольного цирроза вызывает повышенную экспрессию s-VCAM-1 и s-ICAM-1 на клетках эндотелия сосудов печени. При этом в сыворотке крови увеличивается концентрация s-ICAM-1, s-VCAM-1 и E-селектина у пациентов с алкогольным циррозом по сравнению со здоровыми лицами [31]. Результаты настоящего исследования подтверждают факт гиперэкспрессии сосудистых адгезивных молекул в клетках эндотелия у пациентов с 4-й степенью фиброза печени. В то же время, злоупотребление алкоголем, не сопровождающееся значительным фиброзным перерождением ткани печени, мало влияет на генерацию s-VCAM-1 и s-ICAM-1. Выявлена существенная корреляция ($p \leq 0,01$) между концентрацией в крови s-ICAM-1 ($r = 0,59$), s-ICAM-1 ($r = 0,56$) и стадией фиброза печени. Кроме того, s-ICAM-1 высоко коррелировал с содержанием в крови провоспалительного цитокина $IL-8$ ($r = 0,672$) и s-VCAM-1 ($r = 0,503$).

Концентрация в крови эндотелина возрастала в 5,6-6,8 раза в группах пациентов с нулевой и 1-3 степенями фиброза печени, а при четвертой степени — в 14,5 раза (табл. 4). Несмотря на большие различия в секреции эндотелина на разных стадиях АБП, не удалось выявить существенную корреляцию между его содержанием в крови и стадией фиброза печени. Ранее было показано последовательное возрастание концентрации эндотелина в плазме крови у пациентов с циррозом печени разной этиологии по мере увеличения степени фиброза [32]. Усиленная секреция вазоконстриктора эндотелина поврежденными клетками эндотелия при алкогольном повреждении печени может быть важным фактором прогрессирования цирроза, так как способствует нарастанию портальной гипертензии.

Таблица 4

Маркеры дисфункции эндотелия в крови пациентов с различной степенью алкогольного фиброза печени

Показатели	Нормы	Степень фиброза F		
		0 (45 чел.)	1—3 (28 чел.)	4 (51 чел.)
VEGF-A	26,3 ± 16,3 пг/мл	656,3 ± 89 ***	499 ± 74 ***	542 ± 97 ***
MCP-1	417 ± 340 пг/мл	500 ± 39	593 ± 59	700 ± 84 ^a
s-VCAM-1	772 ± 207 нг/мл	1003,7 ± 99	1345 ± 185 *	3093 ± 271***, ^{aaa}
s-ICAM-1	518 ± 178 нг/мл	337,2 ± 27	430 ± 59	956 ± 92 ^{aaa}
Эндотелин	0,3 ± 0,13 фмоль/мл	1,69 ± 0,49*	2,05 ± 0,66 **	4,36 ± 1,16***, ^a

Примечание. VEGF-A — васкулоэндотелиальный фактор А; MCP-1 — моноцитарный хемоаттрактантный протеин; s-VCAM-1 — растворимая молекула адгезии сосудистого эндотелия; s-ICAM-1 — растворимая межклеточная молекула адгезии;

Коэффициенты корреляции (r , $p < 0,01$) между маркерами фиброза и дисфункции эндотелия в крови пациентов с различной степенью алкогольного фиброза печени

Коэффициент корреляции	s-ICAM	s-VCAM	Эндотелин
TIMP-1	0,650	0,390	0,440
TIMP-2	0,425	0,360	—
YKL-40	0,580	0,420	0,275
MMP-2	0,520	0,454	—

Примечание: см. подписи к табл. 1 и 4.

Обнаружена существенная корреляция между содержанием в крови маркеров фиброза и маркеров эндотелиальной дисфункции (табл. 5). Таким образом, в патогенезе алкогольного фиброза и цирроза печени существенное значение имеют активация клеток эндотелия сосудов печени и клеток воспаления, приводящее к усиленной выработке воспалительных медиаторов. Они, в свою очередь, привлекают в очаг альтерации печени следующую волну клеток воспаления, запуская порочный круг патогенеза. Повреждение и дисфункция эндотелия сосудов печени приводит к повышенной выработке ростовых факторов и вазоконстрикторов, стимулируя фиброгенез и вызывая дальнейшее нарушение кровотока через печень. Терапевтические стратегии, разрабатываемые с целью предотвращения фиброза печени, должны быть направлены одновременно на ПСЛ, клетки нативного иммунитета (купферовские макрофаги и натуральные киллеры) и эндотелий, так как эти клетки в больших количествах продуцируют провоспалительные цитокины (например, IL-8), стимуляторы фиброгенеза (TGF β), негативные регуляторы натуральных киллеров (TGF β и др.) и вазоконстрикторы (эндотелин), способствующие портальной гипертензии.

Работа выполнена при поддержке гранта РГНФ № 13-06-00279.

Список литературы

- Zhou W.-C., Zhang Q.-B., Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20: 7312-24.
- Battaller R., Brenner D.A. Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.* 2005; 115: 209-218.
- Leroy V., Monier F., Bottari S. et al. Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid. *Am. J. Gastroenterol.* 2004; 99: 271-9.
- Boeker K.H., Haberkorn C.I., Michels D., Flemming P., Manns M.P., Lichtinghagen R. Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin. Chim. Acta.* 2002; 316: 71-81.
- Hirayama C., Suzuki H., Takada A., Fujisawa K., Tanikawa K., Igarashi S. Serum type IV collagen in various liver diseases in comparison with serum 7S collagen, laminin, and type III procollagen peptide. *J. Gastroenterol.* 1996; 31: 242-8.
- Pares A., Deulofeu R., Gimenez A., Caballeria L., Bruguera M., Caballeria J. et al. Serum hyaluronate reflects hepatic fibrogenesis in alcoholic liver disease and is useful as a marker of fibrosis. *Hepatology* 1996; 24: 1399-103.
- McHutchison J.G., Blatt L.M., de Medina M., Craig J.R., Conrad A., Schiff E.R., et al. Measurement of serum hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C and its relationship to liver histology. Consensus Interferon Study Group. — *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2000; 15: 945-51.
- Nojgaard C., Johansen J.S., Christensen E., Skovgaard L.T., Price P.A., Becker U. Serum levels of YKL-40 and PIIINP as prognostic markers in patients with alcoholic liver disease. *J. Hepatol.* 2003; 39: 179-86.
- Kanzler S., Baumann M., Schirmacher P. et al. Prediction of progressive liver fibrosis in hepatitis C infection by serum and tissue levels of transforming growth factor-beta. *J. Viral Hepat.* 2001; 8: 430-7.
- Flisiak R., Maxwell P., Prokopowicz D., Timms P.M., Panasiuk A. Plasma tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and transforming growth factor beta 1-possible non-invasive biomarkers of hepatic fibrosis in patients with chronic B and C hepatitis. *Hepatogastroenterology.* 2002; 49: 1369-72.
- Bosch J., Abraldes J.G., Fernandez M., Garcia-Pagan J.C. Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: New targets in the treatment of portal hypertension. *J. Hepatol.* 2010; 53: 558-67.
- Iwakiri Y. Endothelial dysfunction in the regulation of cirrhosis and portal hypertension. *Liver Int.* 2012; 32: 199-213.
- Gracia-Sancho J., Lavina B., Rodriguez-Vilarrupla A. et al. Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: a potential mechanism contributing to reduced nitric oxide bioavailability. *Hepatology.* 2008; 47: 1248-56.
- Thurman R.G. Mechanisms of hepatic toxicity II. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin. *Am. J. Physiol.* 1998; 275: G605-G611.
- McClain C.J., Song Z., Barve S.S., Hill D.B., Deaciuc I. Recent advances in alcoholic liver disease. IV. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease. *Am. J. Physiol.: Gastrointestinal and Liver Physiology.* 2004; 287: G497-G502.
- Панченко Л.Ф., Пирожков С.В., Наумова Т.А., Теребилена Н.Н., Баронец В.Ю., Федоров И.Г., Тотолян Г.Г. Изменение профиля воспалительных и проти-

вовоспалительных цитокинов при развитии алкогольной болезни печени. *Наркология*. 2010; 4: 68-77.

17. Hirayama C., Suzuki H., Takada A., Fujisawa K., Tanikawa K., Igarashi S. Serum type IV collagen in various liver diseases in comparison with serum 7S collagen, laminin, and type III procollagen peptide. *J. Gastroenterol.* 1996; 31: 242-8.

18. Kinoshita J., Fushida S., Harada S., Makino I., Nakamura K., Oyama K., et al. Type IV collagen levels are elevated in the serum of patients with peritoneal dissemination of gastric cancer. *Oncology Letters*. 2010; 1: 989-94.

19. Huang Z., Chen X., Zhao Q., Zheng Y., Peng L., Gao Z. et al. An albumin, collagen IV, and longitudinal diameter of spleen scoring system superior to APRI for assessing liver fibrosis in chronic hepatitis B patients. *Int. J. Infect. Dis.* 2015; 31: 18-22.

20. Li J., Rosman A.S., Leo M.A., Nagai Y., Lieber C.S. Tissue inhibitor of metalloproteinase is increased in the serum of precirrhotic and cirrhotic alcoholic patients and can serve as a marker of fibrosis. *Hepatology*. 1994; 19: 1418-1423.

21. Chou R., Wasson N. Blood tests to diagnose fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Ann. Intern. Med.* 2013; 37: 392-400.

22. Baranova A., Priyanka L., Biredinc A., Younoszi Z.M. Non-invasive markers for hepatic fibrosis. *BMC Gastroenterology*. 2011; 11: 91-105.

23. McClain C.J., Song Z., Barve S.S., Hill D.B., Deaciuc I. Recent advances in alcohol liver disease. VI. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2004; 287: G497-G502.

24. Kawaratan H., Tsujimoto T., Douhara A., Takaya H., Moriya K., Namisaki T., et al. The effect of inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *Mediators of inflammation*. 2013; 2013: 1-10.

25. Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 1995; 13: 251-65.

26. Niemela O., Juvonen T., Pakkila S. Immunohistochemical demonstration of acetaldehyde-modified epitopes in human liver after alcohol consumption. *J. Clin. Invest.* 1991; 87: 1367-74.

27. Purohit V., Gao G., Song B.J. Molecular mechanisms of alcoholic fatty liver. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2009; 33: 191-205.

28. Wynn T.A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.* 2008; 214: 199-210.

29. Fisher N.C., Neil D.A.H., Williams A., Adams D.H. Serum concentrations and peripheral secretion of the beta-chemokines monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage inflammatory protein 1 α in alcoholic liver disease. *Gut*. 1999; 45: 16-420.

30. Fisher N., Afford S., Adams D.H. Adhesion molecules and alcoholic liver disease. *Hepato-Gastroenterol.* 1996; 43:1113-1116.

31. Adams D.H., Burra P., Hubscher S.G., Elias E., Newman W. Endothelial activation and circulating vascular adhesion molecules in alcoholic liver disease. *Hepatology*. 1994; 19: 588-94.

32. Curgunlu A., Vural P., Canbaz M., Erten N., Karan M.A., Tascioglu C. Plasma nitrate/nitrite and endothelin-1 in patients with liver cirrhosis. *J. Clin. Lab. Anal.* 2005; 19:177-81.

References

1. Zhou W.-C., Zhang Q.-B., Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20: 7312-24.

2. Batailler R., Brenner D.A. Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.* 2005; 115: 209-18.

3. Leroy V., Monier F., Bottari S. et al. Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronin acid. *Am. J. Gastroenterol.* 2004; 99: 271-9.

4. Boeker K.H., Haberkorn C.I., Michels D., Flemming P., Manns M.P., Lichtinghagen R. Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin. Chim. Acta.* 2002; 316: 71-81.

5. Hirayama C., Suzuki H., Takada A., Fujisawa K., Tanikawa K., Igarashi S. Serum type IV collagen in various liver diseases in comparison with serum 7S collagen, laminin, and type III procollagen peptide. *J. Gastroenterol.* 1996; 31: 242-8.

6. Pares A., Deulofeu R., Gimenez A., Caballeria L., Bruguera M., Caballeria J., et al. Serum hyaluronate reflects hepatic fibrogenesis in alcoholic liver disease and is useful as a marker of fibrosis. *Hepatology* 1996; 24: 1399-403.

7. McHutchison J.G., Blatt L.M., de Medina M., Craig J.R., Conrad A., Schiff E.R., et al. Measurement of serum hyaluronin acid in patients with chronic hepatitis C and its relationship to liver histology. Consensus Interferon Study Group. — *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2000; 15: 945-51.

8. Nojgaard C., Johansen J.S., Christensen E., Skovgaard L.T., Price P.A., Becker U. Serum levels of YKL-40 and PIIINP as prognostic markers in patients with alcoholic liver disease. *J. Hepatol.* 2003; 39: 179-86.

9. Kanzler S., Baumann M., Schirmacher P., et al. Prediction of progressive liver fibrosis in hepatitis C infection by serum and tissue levels of transforming growth factor-beta. *J. Viral Hepat.* 2001; 8: 430-7.

10. Flisiak R., Maxwell P., Prokopowicz D., Timms P.M., Panasiuk A. Plasma tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and transforming growth factor beta 1-possible non-invasive biomarkers of hepatic fibrosis in patients with chronic B and C hepatitis. *Hepatogastroenterology*. 2002; 49: 1369-72.

11. Bosch J., Abraldes J.G., Fernandez M., Garcia-Pagan J.C. Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: New targets in the treatment of portal hypertension. *J. Hepatol.* 2010; 53: 558-67.

12. Iwakiri Y. Endothelial dysfunction in the regulation of cirrhosis and portal hypertension. *Liver Int.* 2012; 32: 199-213.

13. Gracia-Sancho J., Lavina B., Rodriguez-Villarupla A., et al. Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: a potential mechanism contributing to reduced nitric oxide bioavailability. *Hepatology*. 2008; 47: 1248-56.

14. Thurman R.G. Mechanisms of hepatic toxicity II. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin. *Am. J. Physiol.* 1998; 275: G605-G611.

15. McClain C.J., Song Z., Barve S.S., Hill D.B., Deaciuc I. Recent advances in alcoholic liver disease. IV. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease. *Am. J. Physiol.: Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2004; 287: G497-G502.

16. Panchenko L.F., Pirozhkov S.V., Naumova T.A., Terbilina N.N., Baronets V.Ju., Fedorov I.G., Totoljan G.G. Changing Profile of inflammatory and anti-inflamma-

Поступила 05.05.15

tory cytokines in the development of alcoholic liver disease. *Narkologija*. 2010; 4: 68-77. (in Russian)

17. Hirayama C., Suzuki H., Takada A., Fujisawa K., Tanikawa K., Igarashi S. Serum type IV collagen in various liver diseases in comparison with serum 7S collagen, laminin, and type III procollagen peptide. *J. Gastroenterol.* 1996; 31: 242-8.

18. Kinoshita J., Fushida S., Harada S., Makino I., Nakamura K., Oyama K., et al. Type IV collagen levels are elevated in the serum of patients with peritoneal dissemination of gastric cancer. *Oncology Letters*. 2010; 1: 989-94.

19. Huang Z., Chen X., Zhao Q., Zheng Y., Peng L., Gao Z., et al. An albumin, collagen IV, and longitudinal diameter of spleen scoring system superior to APRI for assessing liver fibrosis in chronic hepatitis B patients. *Int. J. Infect. Dis.* 2015; 31: 18-22.

20. Li J., Rosman A.S., Leo M.A., Nagai Y., Lieber C.S. Tissue inhibitor of metalloproteinase is increased in the serum of precirrhotic and cirrhotic alcoholic patients and can serve as a marker of fibrosis. *Hepatology*. 1994; 19: 1418-23.

21. Chou R., Wasson N. Blood tests to diagnose fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Ann. Intern. Med.* 2013; 37: 392-400.

22. Baranova A., Priyanka L., Bireldinc A., Younossi Z.M. Non-invasive markers for hepatic fibrosis. *BMC Gastroenterology*. 2011; 11: 91-105.

23. McClain C.J., Song Z., Barve S.S., Hill D.B., Deaciuc I. Recent advances in alcohol liver disease. VI. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2004; 287: G497-G502.

24. Kawaratani H., Tsujimoto T., Douhara A., Takaya H., Moriya K., Namisaki T., et al. The effect of inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *Mediators of inflammation*. 2013; 2013: 1-10.

25. Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 1995; 13: 251-65.

26. Niemela O., Juvonen T., Pakkila S. Immunohistochemical demonstration of acetaldehyde-modified epitopes in human liver after alcohol consumption. *J. Clin. Invest.* 1991; 87: 1367-74.

27. Purohit V., Gao G., Song B.J. Molecular mechanisms of alcoholic fatty liver. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2009; 33: 191-205.

28. Wynn T.A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.* 2008; 214: 199-210.

29. Fisher N.C., Neil D.A.H., Williams A., Adams D.H. Serum concentrations and peripheral secretion of the beta-chemokines monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage inflammatory protein 1 α in alcoholic liver disease. *Gut*. 1999; 45: 416-20.

30. Fisher N., Afford S., Adams D.H. Adhesion molecules and alcoholic liver disease. *Hepato-Gastroenterol.* 1996; 43:1113-6.

31. Adams D.H., Burra P., Hubscher S.G., Elias E., Newman W. Endothelial activation and circulating vascular adhesion molecules in alcoholic liver disease. *Hepatology*. 1994; 19: 588-94.

32. Curgunlu A., Vural P., Canbaz M., Erten N., Karan M.A., Tascioglu C. Plasma nitrate/nitrite and endothelin-1 in patients with liver cirrhosis. *J. Clin. Lab. Anal.* 2005; 19: 177-81.

Received 05.05.15

Сведения об авторах:

Панченко Леонид Федорович, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, зав. лаб. биохимии ФГБУ ФМИЦПН им. В.П. Сербского Минздрава России, зав. лаб. молекулярных основ болезней зависимости ФГБНУ НИИ ОПП

Пирожков Сергей Викторович, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова» Минздрава России

Наумова Татьяна Александровна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. биохимии ФГБУ ФМИЦПН им. В.П. Сербского Минздрава России

Баронец Валерия Юрьевна, ст. науч. сотр. лаб. биохимии ФГБУ ФМИЦПН им. В.П. Сербского Минздрава России

Балашова Анастасия Александровна, аспирант каф. факультетской терапии медицинского института ФГАОУ ВО РУДН

Гармаш Ирина Владимировна, канд. мед. наук, доцент каф. факультетской терапии медицинского института ФГАОУ ВО РУДН

Шакова Ф.М.¹, Калинина Т.И.³, Барсков И.В.², Стельмашук Е.В.²,
Генрихс Е.Е.³, Юрин В.Л.¹, Романова Г.А.¹

Сравнение нейропротективных эффектов производных эритропоэтина при разных способах введения на модели двустороннего фокального ишемического повреждения префронтальной коры мозга крысы

¹ — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение НИИ общей патологии и патофизиологии

² — Федеральное государственное бюджетное учреждение Научный центр неврологии

³ — Федеральное государственное унитарное предприятие государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов

Сравнение нейропротективных и антиамнестических эффектов цитопротекторных карбамиллированных форм ЕРО и его производных ЕРО-Fc и ЕРО-TR проведено на модели фототромбоза префронтальной коры мозга крыс при внутрибрюшинном и интраназальном способах введения через 1 ч после ишемического повреждения коры. При сравнении двух способов введения показана ноотропная и нейропротективная активность гибридных белков, причем наиболее выраженный эффект был достигнут при внутрибрюшинном введении ЕРО-TR и интраназальном введении ЕРО-Fc.

Ключевые слова: фототромбоз; префронтальная кора мозга крыс; эритропоэтин; его производные: ЕРО-TR, ЕРО-Fc; интраназальное и внутрибрюшинное введение

Shakova F.M.¹, Kalinina T.I.³, Barskov I.V.², Stelmashuk E.V.²,
Genrixc E.E.², Yrin V.L.³, Romanova G.A.¹

Comparison of neuroprotective effects of derivatives of eritropoetine by different way of bringing in drugs with model of bilateral photochemically induced thrombosis of the prefrontal cortex of rat brain

¹ — FGBU NII General Pathology and Pathophysiology

² — FGBU Scientific Center of Neurology

³ — State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms GosNIIGenetika

It was stated with model of bilateral photochemically induced thrombosis of the prefrontal cortex by injected intranasally or intraperitoneally in 1h after operation new derivatives of eritropoetine: Epo, Epo-Fc, Epo-Tr provoked neuroprotective and antiamnestic action. Epo-Fc demonstrated more effective action by intranasal injection.

Key words: photothrombosis; prefrontal cortex; derivatives of eritropoetine: Epo, Epo-Fc, Epo-Tr; neuroprotective and antiamnestic action; intranasal and intraperitoneal injection

Ишемический инсульт занимает второе место в структуре общей смертности и первое — как причина стойкой утраты трудоспособности. Более 85% всех инсультов регистрируются в развивающихся странах [1]. Развитие инсульта приводит к морфологическому дефекту мозговых структур и функциональным расстройствам.

Фокальная церебральная ишемия обусловлена недостаточностью кровоснабжения определённого уча-

стка головного мозга в условиях тромбоза, геморрагии или травмы мозга и ее проявления и тяжесть зависят от места локализации очага. В первую очередь возникают когнитивные расстройства, выражающиеся в нарушениях памяти, способности к обучению и анализу ситуации, затруднениях принятия решений, а также двигательные дисфункции и параличи. Поиск лекарственных средств, снижающих степень нейродегенерации и улучшающих функции ЦНС, нарушенные при инсульте, является актуальной медицинской и социально значимой задачей.

Основные проблемы создания и применения препаратов цитоЕРО связаны как с «выключением» его

Для корреспонденции: Шакова Ф.М., канд. мед.наук, вед. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы ФГБНУ НИИ ОПП, e-mail: shakova.fatima@yandex.ru

гемопоэтической активности, так и с оптимизацией цитопротекторной функции молекулы ЕРО за счет пролонгации её действия в организме. С этой целью были получены варианты генно-инженерных гибридов ЕРО с неонатальным Fc-фрагментом иммуноглобулина человека и фрагментом человеческого гликопептида MUC1-(TR), несущего дополнительные сайты O-гликозилирования. Пролонгация в данном случае достигается не только за счет увеличения молекулярного веса белка, что приводит к изменению его гидродинамических свойств и снижает клиренс препарата через почки, но и за счет механизма рециркуляции белка через неонатальные рецепторы (F_{сп}) экспрессированные на эндотелии. Тот или другой механизм взаимодействия определяет индивидуальные терапевтические свойства препарата, его форму: инфузионную или ингаляционную. Ранее было продемонстрировано присутствие неонатального F_{сп} рецептора на клетках эпителия сосудов мозга [3]. Анализ фармакокинетических свойств показал, что полученные гибридные белки обладают пролонгированным временем полужизни (в 2-2,5 раза) по сравнению со стандартным ЕРО [4]. Была разработана методика карбамилирования, позволяющая получить препараты белков, не обладающих эритропоэтической активностью, но сохраняющих нейропротекторные свойства [5].

Одной из экспериментальных моделей, которая наиболее полно воспроизводит клиническую картину фокального ишемического инфаркта мозга, является фотохимический тромбоз кровеносных сосудов коры. Использование данной модели дает возможность количественной оценки нейропротективного и антиамнестического действия препаратов, используемых для фармакологической коррекции ишемической патологии мозга [6-8].

Целью данной работы было сравнение нейропротективных и антиамнестических эффектов цитопротекторных карбамилированных форм ЕРО и его производных ЕРО-Fc и ЕРО-TR при внутрибрюшинном и интраназальном способах введения на модели фототромбоза сосудов префронтальной коры мозга крыс.

Методика

Опыты выполнены на 67 самцах беспородных белых крыс массой 200-220 г, содержащихся в виварии при свободном доступе к пище и воде и естественной смене светового режима. При работе соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований. Введение всех исследованных карбами-

лированных форм производных эритропоэтина осуществлялось однократно, внутрибрюшинно в дозе 50 мкг/кг или интраназально в дозе 25 мкг/кг в черед 1 ч после фототромбоза префронтальной коры головного мозга крыс.

Все экспериментальные животные были разделены на 2 серии по 4 группы в каждой:

I. Внутрибрюшинное введение исследуемых веществ:

1. Фототромбоз + 0,9% раствор NaCl в объеме 50 мкл (n = 8);

2. Фототромбоз + ЕРО в дозе 50 мкг/кг (n = 8);

3. Фототромбоз + ЕРО-TR в дозе 50 мкг/кг (n = 8);

4. Фототромбоз + ЕРО-Fc в дозе 50 мкг/кг (n = 7).

II. Интраназальное введение исследуемых веществ:

1. Фототромбоз + 0,9% раствор NaCl в объеме 25 мкл (n = 10);

2. Фототромбоз + ЕРО в дозе 25 мкг/кг (n = 6);

3. Фототромбоз + ЕРО-TR в дозе 25 мкг/кг (n = 10);

4. Фототромбоз + ЕРО-Fc в дозе 25 мкг/кг (n = 10).

Для оценки функционального состояния животных исследовали уровень их двигательной активности (ДА) в автоматизированной установке РОДЭО-1, время наблюдения 5 мин. Анализ ДА проводили до и на 4-е сутки после фототромбоза префронтальной коры, при этом ДА в экспериментальных группах животных до и после операции не имела значимых различий.

Условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ) вырабатывали по ранее описанной схеме [9]. Определяли латентный период (ЛП) — время, которое проходило от начала теста до момента пересечения крысой отверстия, разделяющего освещенный и темный отсеки камеры. При повторном заходе крысы в темный отсек камеры дверь в него закрывали и через металлические прутья пола пропускали электрический ток (1,3 мА, 50 Гц, 5 с). УРПИ считали выработанным, если ЛП составлял не менее 300 с. Животных с меньшим ЛП исключали из эксперимента. Оценку антиамнестического действия исследуемых гибридных белков проводили на 4-е сутки после индукции коркового инфаркта.

Двусторонний фокальный ишемический инфаркт префронтальной коры головного мозга крыс (цитоархитектонические поля Frl и Fr2) создавали методом фотохимически индуцируемого тромбоза [10, 11]. Операцию проводили под наркозом (внутрибрюшин-

ное введение хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг). После введения фотосенсибилизирующего красителя бенгальского розового (внутривенно 40 мг/кг, «Sigma», USA) крысу фиксировали в стереотаксисе. Для облучения использовали специальную установку, состоящую из источника холодного света — галогеновой лампы мощностью 250 Вт и световода с диаметром внутреннего сечения 3 мм. Световод устанавливали на расстоянии 1 мм от поверхности черепа, на 2 мм роstralнее брегмы и на 2 мм латеральнее сагиттального шва и облучали через кость черепа каждое из полушарий мозга холодным светом длиной волны 560 нм в течение 15 мин.

Для морфометрического измерения площади очага серийного среза и объема ишемического повреждения использовали мозг экспериментальных животных, фиксированный методом погружения в смесь формалин-спирт-уксусная кислота (ФУС) в пропорции 2:7:1 на ночь. После фиксации материал переносили на сутки в 70%-ный спирт и резали в дистиллированной воде на вибротоме 1000 (Tecpical Product international inc., USA) с шагом 100 мкм. Каждый второй срез последовательно монтировали на предметных стеклах, покрытых желатином, окрашивали 0,2% водным метиленовым синим. Далее препараты обрабатывали по стандартной гистологической методике: обезживали в спирте восходящей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в бальзам. Гистологические препараты сканировали на слайдовой приставке сканера V100 PHOTO (Epson, USA). Этот метод позволяет получить файл с изображением среза мозга нежно-голубого цвета, на котором четко виден очаг ишемического повреждения — темноокрашенный по краю и светлый в середине. Иногда некротическая ткань распадалась, в таком случае очагом поражения считали недостающий участок ткани. Для определения площади ишемического повреждения использовали специализированную компьютерную программу Image J («Bethesda», США).

Объем очага повреждения фотоиндуцированным тромбозом определяли по формуле:

$$V = \sum S_n \cdot d,$$

где:

d — толщина пары срезов (200 мкм);

S_n — измеренная площадь ишемического очага серийного среза (мм²);

Σ — сумма объемов ишемического повреждения на срезах.

Коэффициент эффективности защиты (КЭЗ) рассчитывали по формуле:

$$\text{КЭЗ} = (V_0 - V_B) / V_0 \cdot 100\%,$$

где:

V_0 — средний суммарный объем очага поражения у животных с введением физраствора;

V_B — средний объем очага поражения у животных с введением вещества.

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы Statistica 6.0. Для сравнения показателей латентного периода в тесте УРПИ использовали U-критерий Манна—Уитни для независимых выборок и критерий Вилкоксона для парных сравнений для связанных выборок. Статистическую значимость различий объемов инфаркта оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Ранее показано, что фотохимически индуцируемый двусторонний тромбоз кровеносных сосудов в префронтальной области коры головного мозга крыс приводит к формированию ишемического очага, который захватывает всю толщину коры и отделен от окружающей неповрежденной ткани четко выраженной границей, такое повреждение коры сопровождается потерей выработанного до ишемии условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) [7, 12—13].

В предыдущих исследованиях получены данные, свидетельствующие о том, что новые гибридные белки на основе рекомбинантного эритропоэтина человека (ЕРО): карбамилированные формы ЕРО-Fc и ЕРО-TR при их внутрибрюшинном введении через 1ч после ишемического повреждения коры способствуют сохранению условного рефлекса пассивного избегания, выработанного до фототромбоза и уменьшению объема очага ишемии [13]. Таким образом, выявлена ноотропная и нейропротективная активности данных карбамилированных гликопептидных производных ЕРО.

Представляло интерес сравнить эффекты этих гибридных белков при внутрибрюшинном и интраназальном способах введения на модели двустороннего очагового ишемического повреждения префронтальной коры мозга крыс.

Важной особенностью интраназального введения лекарственных препаратов является возможность их проникновения непосредственно в ЦНС. Предполагается, что транспорт лекарственных средств из полости носа в ЦНС осуществляется без участия слизистой, экстрацеллюлярным путем по ходу тройничного и обонятельного нервов. Уже через 10—15 минут химические агенты, введенные интраназально, обнаруживаются в мозге. Данный факт привлекает всеобщее внимание, поскольку обеспечивает новые возможности в лечении заболеваний ЦНС. Теоретически лекарственные препараты проникают в головной мозг только из обонятельной об-

ласти, где существует возможность экстра- и интрацеллюлярного проникновения препаратов через эпителиальный барьер и попадания их не в кровотоки, а непосредственно к оболочкам мозга [14].

Оценку функционального состояния ЦНС проводили по показателям ЛП УРПИ до и после ишемического повреждения коры головного мозга крыс. До фототромбоза у всех обученных экспериментальных животных этот показатель составлял 300 с. Проверку сохранения выработанных до ишемии УРПИ проводили на 4-е сутки после операции.

Так, при внутрибрюшинном введении указанных производных эритропоэтина, ЛП УРПИ составлял на 4-е сутки после ишемии при введении ЕРО-TR — 258 с, ЕРО-Fc — 227 с, ЕРО — 243 с. При интраназальном введении этот показатель составил при введении ЕРО-Fc — 248 с, ЕРО-TR — 182 с и ЕРО — 169 с.

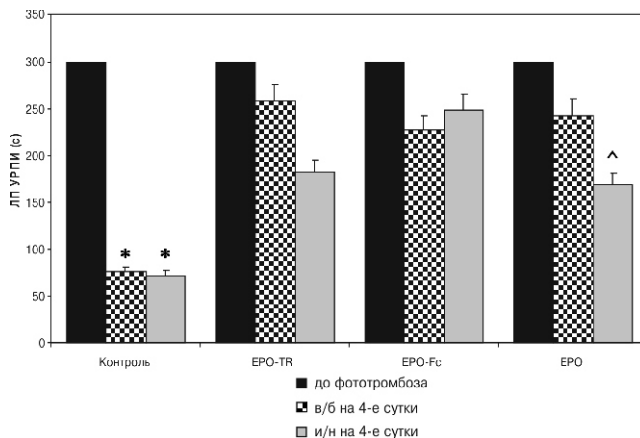
Таким образом, антиамнестический эффект ЕРО-TR был более выражен при внутрибрюшинном введении, тогда как при интраназальном введении был более эффективен ЕРО-Fc (рисунок).

Для морфометрического измерения объема ишемического очага использовали мозг тех же экспериментальных животных, фиксированный на 4-е сутки после окончания исследования. При внутрибрюшинном введении коэффициент защитного эффекта (КЭЭ), вычисленный по формуле (см. методику), был достоверен только для пролонгированного препарата ЕРО-TR и составил 34% [13].

При интраназальном введении производных эритропоэтина объем ишемического повреждения достоверно ($P < 0,05$) снижался по отношению к нелеченым крысам с фототромбозом префронтальной коры ($28,9 \pm 2,2$) как при введении ЕРО-TR ($15,0 \pm 1,8$), так и при введении ЕРО-Fc ($14,3 \pm 2,5$).

При интраназальном способе введения, самый высокий защитный эффект выявлен у ЕРО-Fc — 47,02%, чуть меньше у ЕРО-TR в той же серии опытов — 45,13%, КЭЭ ЕРО составил 24,6%.

Таким образом, можно заключить, что при интраназальном введении ЕРО-Fc и ЕРО-TR после дву-



Влияние внутрибрюшинного (50 мкг/кг) и интраназального (25 мкг/кг) введения карбамилированных форм белков ЕРО, ЕРО-TR, ЕРО-Fc на сохранение УРПИ у крыс с двусторонним фототромбозом префронтальной коры;

* $p < 0,001$ по сравнению с ЛП до фототромбоза; ^ $p < 0,05$ по сравнению с ЛП до фототромбоза.

стороннего фотохимического повреждения префронтальной коры крыс получены данные, свидетельствующие об антиамнестическом и нейропротективном действии данных карбамилированных гликопептидных производных ЕРО. Причем при сравнении этих показателей с нейропротективным эффектом лекарственного препарата Семакс [15], полученным в эксперименте на той же модели [6], его КЭЭ (27%) был практически вдвое ниже, чем у производных ЕРО.

Наши данные хорошо согласуются с данными других авторов, которые продемонстрировали, что при интраназальном введении, эритропоэтин эффективно преодолевает гемато-энцефалический барьер и обладает нейропротекторными свойствами даже при уменьшении дозы введения. что было показано на модели фокальной церебральной ишемии [16, 17].

Интересно, что при интраназальном введении препараты ЕРО-TR и ЕРО-Fc показали, значительно большую эффективность, чем ЕРО. Этот феномен, по-видимому, может быть объяснен пролонгированностью данных гибридов эритропоэтина. Необходимо отметить, что наибольшая нейропротекторная и ноот-

Таблица

Морфометрическое измерение среднего и суммарного (на крысу) объема очага ишемического повреждения по группам

Группы животных	0,9% раствор NaCl, 0,5 мл	ЕРО	ЕРО-TR	ЕРО-Fc
Суммарный объем (мм ³) повреждения мозга на крысу при интраназальном введении	$28,9 \pm 2,2$	$21,8 \pm 1,9$	$15,0 \pm 1,8^*$	$14,3 \pm 2,5^*$
Суммарный объем (мм ³) повреждения мозга на крысу при внутрибрюшинном введении	$24,22 \pm 4,7$	$28,8 \pm 7,5$	$15,8 \pm 5,4^*$	$23,5 \pm 4,0$

Примечание. $p < 0,05$ по сравнению с группой с введением раствора NaCl 0,9%

ропная активность была достигнута при интраназальном введении ЕРО-Fc. Учитывая присутствие неонатального Fc α 1 рецептора на клетках эпителия сосудов мозга, можно предположить, что взаимодействие этого белка с рецептором помогает более эффективному проникновению ЕРО-Fc в мозг и как следствие более эффективному цитопротекторному действию.

Работа поддержана субсидией Президиума РАН по программе «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий» на 2014 г.

Список литературы

- Mohr J.P. et al. *Stroke: Pathophysiology, Diagnosis, and Management* / под ред. J.P. Mohr. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2011. Вып. 5th.
- Шахнович В.А. *Ишемический инсульт. Нейросонология*. Москва: «АСТ», Научно-методическая литература, 2006.
- Schlachetzki F, Zhu C, Pardridge W.M., Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) at the blood \pm brain barrier. *Journal of Neurochemistry*. 2002, 81, 203-6.
- Гаврилова Н.А., Черемных А.М., Бобренева Р.А., Аскерова В.А., Калинина Т.И., Булушова Н.В., Честухина Г.Г., Юрин В.Л. Гемопоэтическая активность и фармакокинетика ЕРО-Fc, ЕРО-Fcneo и Alb-EPO гибридных белков — производных эритропоэтина человека. *Биотехнология*. 2012; 5: 38-49.
- Калинина Т.И., Юрин В.Л. Гибридный белок на основе рекомбинантного эритропоэтина человека, обладающий пролонгированным действием (варианты), и способ его получения. Изобретение МПК: C07K14/505, C12N15/62.
- Романова Г.А., Силачев Д.Н., Шакова Ф.М., Викторова И.В., Шрам С.И., Мясоедов Н.Ф. Нейропротективное и антиамнестическое действие пептида семакса при экспериментальном ишемическом инфаркте коры головного мозга. *Бюлл. exper. биол. и мед.* 2006; 142(12): 618-21.
- Силачев Д.Н., Шрам С.И., Шакова Ф.М., Романова Г.А., Мясоедов Отдаленные эффекты синтетического аналога АКГГ(4-10) на формирование пространственной памяти у крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры головного мозга. *Журнал Высшей нервной деятельности им И.П. Павлова*. 2008; 45(4): 458-66.
- Гудашева Т.А., Романова Г.А., Шакова, И.В. Барсков, Е.В. Стельмашук Нейропротекторное и антиамнестическое действие дипептидного миметика фактора роста нервовГК-2Н при экспериментальном ишемическом инфаркте мозга крыс. *Журнал экспериментальной и клинической фармакологии*. 2012; 10: 50-4.
- Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж.П. *Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения*. М.; Высш. школа, 1991.
- Paxinos G., Watson S. *Atlas of anatomy of rat brain. The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press. 1986.
- Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R. et al. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann. Neurol.* 1985; 17(5): 497-504.
- Романова Г.А., Барсков И.В., Викторова И.В. Поведенческие и морфологические нарушения, вызванные двусторонним фотоиндуцированным тромбозом мозговых сосудов лобной коры мозга крыс. *Патол. физиол. и эксперим. терапия*. 1998; 2: 8-10.
- Романова Г.А., Шакова Ф.М., Барсков И.В., Стельмашук Е.В., Генрихс Е.Е., Черемных А.М., Калинина Т.И., Юрин В.Л. Нейропротективное и антиамнестическое действие производных эритропоэтина при экспериментальном ишемическом повреждении коры головного мозга. *Бюлл. exper. биол. и мед.* 2014; 158(9): 299-308.
- Привалова А.М., Гуляева Н.В., Букреева Т.В. Интраназальное введение — перспективный способ доставки лекарственных веществ в мозг. *Нейрохимия*. 2012; 29(2): 93-105.
- Шевченко К.В., Нагаев И.Ю., Алфеева Л.Ю., Андреева Л.А., Каменский А.А., Левицкая Н.Г., Шевченко В.П., Гривенников И.А., Мясоедов Н.Ф. Кинетика проникновения семакса в мозг и кровь крыс при интраназальном введении. *Биоорганическая химия*. 2006; 32(1): 64-70.
- Yue-Ping Yu, Qiu-Qin Xua, Qi Zhang, Wei-Ping Zhang, Li-Hui Zhang, Er-Qing Wei Intranasal recombinant human erythropoietin protects rats against focal cerebral ischemia. *Neuroscience Letters*. 2005; 387: 5-10.
- Yamila Rodriguez Cruz, Yuneidis Mengana Tamos, Adriana Munoz Cernuda, Nelvis Subiros Martinez, Alina Gonzalez-Quevedo4, Iliana Sosa Teste, and Julio Cesar Garcia Rodriguez. Treatment with Nasal Neuro-EPO Improves the Neurological, Cognitive, and Histological State in a Gerbil Model of Focal Ischemia. *The Scientific World Journal*. 2010; 10: 2288-300.

Поступила 29.06.15

References

- Mohr J.P. et al. *Stroke: Pathophysiology, Diagnosis, and Management* / под ред. J.P. Mohr. Philadelphia: Elsevier Saunders. 2011. Vyp. 5th.
- Shahnovich V.A. *Ischemic insult. Neurosonologiya*. Scientific and methodological literature. Moscow: «АСТ», Scientific-methodologic literature; 2006.
- Schlachetzki F, Zhu C, Pardridge W.M., Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) at the blood \pm brain barrier. *Journal of Neurochemistry*. 2002; 81: 203-6.
- Gavrilova N.A., Cheremnych A.M., Bobreneva R.A., Askerova V.A., Kalinina T.I., Bulushova N.B., Chestuhina G.G., Urin V.L. Haemopoetic activity and pharmacokinetics of EPO-Fc, EPO-Fcneo and Alb-EPO of hybrid proteins — derivatives of an erythropoietin of the person. *Biotechnology*. 2012; 5: 38-49.
- Kalinina T.I., Yurin V. L. *The hybrid protein on the basis of a recombinant erythropoietin of the person possessing the prolonged action (options), and a way of its receiving*. Invention of MPK: C07K14/505, C12N15/62.
- Romanova G.A., Silachev D.N., Shakova F.M., Victorova I.V., Shram S.I., Myasoyedov N.F. Neuroprotective and anti-amnestic action neuropeptide Semax with experimental ischemic insult of rat brain cortex. *Bull. exper. biol. i med.* 2006; 142(12): 618-21.

7. Silachev D. N., S. I., Shakova F.M. Shram S.I., Romanova G. A., Myasoyedov N.F. The remote effects of synthetic analog of AKTG(4-10) on formation of spatial memory at rats with ischemic damage of prefrontal cortex of brain. *Zurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti im. I.P. Pavlova*. 2008; 45(4): 458-66.
8. Gudasheva T.A., Romanova G. A., Shakova F.M., Barskov I.V., Stelmashuk E.V. Neuroprotective and anti-amnesic action of a dipeptidny mimetik of a factor of growth nervovgk-2H at an experimental ischemic heart attack of a rat brain. *Zurnal experimentlnoy i klinicheskoy farmacologii*. 2012; 10: 50-4.
9. Buresh Ya., Bureshova O., Huston Dzh. P. *Techniques and main experiments on studying of a brain and behavior*. M.: Vyssh. School; 1991.
10. Paxinos G., Watson S. *Atlas of anatomy of rat brain. The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press; 1986.
11. Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R. et al. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann. Neurol.* 1985; 17(5): 497-504.
12. Romanova G.A., Barskov I.V., Victorov I.V. The behavioural and morphological disturbances caused by the bilateral photoinduced thrombosis of brain vessels of the frontal cortex of a rat brain. *Pathol. Fisiol. i experim. Terapiya*. 1998; 2: 8-10.
13. Romanova G.A., Shakova F.M., Barskov I.V., Stelmashuk E.V., Genrikhs E.E., Cheremnykh A.M. Kalinina T.I., Yurin V.L. Neuroprotective and anti-amnesic action of derivatives of an eritropoetin at experimental ischemic damage of brain cortex. *Bull. Eksp. biol. i med.* 2014; 158(9): 299-308.
14. Privalova A. M., Gulyaeva N. V., Bukreeva T. V. Intranasal introduction — a perspective way of delivery of medicine substances in a brain. *Neurochemistry*. 2012; 29(2): 93-105.
15. Shevchenko K.V., Nagayev I.Yu., Alfeeva L.Yu., Andreyeva L.A., Kamensky A.A., Levitskaya N. G., Shevchenko V.P., Grivennikov I.A., Myasoyedov of N. F. Kinetik of penetration of a semaks into a brain and blood of rats at intranasal introduction. *Bioorgan. himiya*. 2006; 32(1): 64-70.
16. Yue-Ping Yu, Qiu-Qin Xua, Qi Zhang, Wei-Ping Zhang, Li-Hui Zhang, Er-Qing Wei Intranasal recombinant human erythropoietin protects rats against focal cerebral ischemia. *Neuroscience Letters*. 2005, 387: 5-10.
17. Yamila Rodriguez Cruz, Yuneidys Mengana Tamos, Adriana Munoz Cernuda, Nelvis Subiros Martines, Alina Gonzalez-Quevedo4, Iliana Sosa Teste, and Julio Cesar Garcia Rodriguez. Treatment with Nasal Neuro-EPO Improves the neurological, cognitive, and histological state in a Gerbil Model of focal Ischemia. *The Scientific World Journal*. 2010; 10: 2288-300.

Received 29.06.15

Сведения об авторах:

Калинина Т.И., канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ФГУП государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов

Барсков И.В., канд. мед. наук, ст. науч. сотр., ФГБНУ Центр неврологии

Стельмашук Е.В. доктор мед. наук, вед. науч. сотр., ФГБНУ Центр неврологии

Генрихс Е.Е. канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ФГБНУ Центр неврологии

Юрин В.Л., канд. мед. наук, зав. лаб. ФГУП государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов

Романова Г.А., доктор биол. наук, гл. науч. сотр. ФГБНУ НИИ ОПП лаб. общей патологии нервной системы

Куликов В.П.^{1,2}, Трегуб П.П.^{1,2}, Ковзелев П.Д.¹, Дорохов Е.А.¹, Белоусов А.А.¹

Гиперкапния — альтернативный гипоксии сигнальный стимул для повышения HIF-1 α и эритропоэтина в головном мозге

¹ — ГБОУ ВПО Алтайский государственный медицинский университет Минздрава России, 656038, Алтайский край, г.Барнаул, пр. Ленина, д. 40

² — ФГБУ НИИ физиологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, 630117, г.Новосибирск, ул. Тимакова, 4

Исследована роль гиперкапнического компонента в механизме активации HIF-1 α и увеличении синтеза эритропоэтина при сочетанном и изолированном воздействии гипоксии и гиперкапнии. Установлено, что содержание исследуемых белков значимо повышается как при изолированном воздействии гипоксии и гиперкапнии, так и при их сочетанном воздействии. Причем, гиперкапническая гипоксия вызывает максимальную активацию синтеза эритропоэтина и накопления HIF-1 α , а перmissive гиперкапния способствует повышению их содержания в большей степени, чем гипоксическое воздействие.

Ключевые слова: гипоксия; гиперкапния; эритропоэтин; HIF-1 α ; толерантность к ишемии; резистентность к гипоксии

Kulikov V.P.^{1,2}, Tregub P.P.^{1,2}, Kovzelev P.D.¹, Dorokhov E.A.¹, Belousov A.A.¹

Hypercapnia — alternative hypoxia signal incentives to increase HIF-1 α and erythropoietin in the brain

¹ — Altay State Medical University, Lenin st., 40, Barnaul, 656038

² — Scientific-Research Institute of Physiology and Fundamental Medicine, Timakov st., 4, Novosibirsk, 630117

Investigated the role of hypercapnic component in the mechanism of activation of HIF-1 α and increase the synthesis of erythropoietin in the combined and the isolated impact of hypoxia and hypercapnia. It was found that the content of proteins of interest significantly increases both in isolated hypoxia and hypercapnia, and at their combined effect. Moreover, the hypercapnic hypoxia causes maximum activation of the synthesis and accumulation of erythropoietin HIF-1 α , and permissive hypercapnia enhances their content more than hypoxic exposure.

Keywords: hypoxia; hypercapnia; erythropoietin; HIF-1 α ; tolerance to ischemia; resistance to hypoxia

Известно, что механизм увеличения толерантности органов и тканей к гипоксии базируется на эффекте накопления транскрипционного фактора HIF-1 α [1] с последующим увеличением экспрессии генов, усиливающих синтез эритропоэтина [2, 3], фактора роста эндотелия сосудов VEGF [4] и нейротекторных белков [5, 6].

Нами было показано, что гиперкапния, а особенно, ее сочетание с дефицитом кислорода, обладают превосходящим гипоксию эффектом повышения толерантности организма к гипоксии/ишемии [7, 8]. Поэтому, важно выяснить, какую роль в этом процессе играет механизм активации HIF-1 α .

Ранее мы показали, что гиперкапния и гиперкапническая гипоксия стимулируют ангиогенез [9], активируют продукцию VEGF и нейротрофического белка S-100 β [10]. Увеличение концентрации HIF-1 α в ткани головного мозга при моделировании гиперкапнии было продемонстрировано Хуа J. и соавт. [11], при введении крысам блокатора карбоангидразы (ацетазоламида) в нормоксических условиях, хотя авторы напрямую не связывали этот эффект с действием углекислого газа.

Учитывая, что гиперкапния оказывает влияние на системы адаптации к гипоксии, непосредственно связанные с HIF-1 α , мы предположили, что гиперкапния самостоятельно может стимулировать накопление данного транскрипционного фактора. Для проверки этой гипотезы было проведено сравнительное исследование влияния сочетанного и изолированного воздействия гипоксии и гиперкапнии на концентрацию HIF-1 α и эритропоэтина в мозге.

Для корреспонденции: Трегуб Павел Павлович, аспирант каф. патофизиологии, ультразвуковой и функциональной диагностики ГБОУ ВПО «Алтайского государственного медицинского университета» Минздрава России, e-mail: rector@agmu.ru, pfiza_astu@mail.ru

Методика

В исследовании использовано 60 крыс-самцов Wistar, массой тела $284,5 \pm 46$ г, которые были разделены на равные 4 группы. Проведение респираторных воздействий осуществлялось в герметичной камере, как описано ранее [7]. Группы животных различались по газовому составу воздуха во время тренировочных воздействий:

1. Группа НГ (нормобарическая гипоксия: $PO_2 = 90$ мм рт.ст.; $PCO_2 = 1$ мм рт.ст.; остальное N_2): в этой группе животные дышали газовой смесью в течение 20 минут в день, таким образом, чтобы PO_2 сохранялось в пределах 90 мм рт.ст.;

2. Группа ПГ (пермиссивная гиперкапния: $PO_2 = 150$ мм рт.ст.; $PCO_2 = 50$ мм рт.ст. остальное N_2): в этой группе животные так же дышали газовой смесью в течение 20 минут в день, но PO_2 сохранялось в пределах 150 мм рт.ст., а PCO_2 в пределах 50 мм рт.ст.;

3. Группа ГГ (гиперкапническая гипоксия: $PO_2 = 90$ мм рт.ст.; $PCO_2 = 50$ мм рт.ст. остальное N_2): в этой группе животные так же дышали газовой смесью в течение 20 минут в день, но PO_2 сохранялось в пределах 90 мм рт.ст., а PCO_2 в пределах 50 мм.рт.ст.

4. Группа К (контрольная группа: $PO_2 = 150$ мм рт.ст.; $PCO_2 = 1$ мм рт.ст. остальное N_2): эти животные подвергались тем же экспериментальным процедурам, что и крысы опытных групп, за исключением воздействия гипоксии и/или гиперкапнии.

Крысы всех групп прошли 7-кратный курс респираторных воздействий, соответственно назначению группы. На следующие сутки после завершения респираторных воздействий животные подвергались эвтаназии методом цервикальной дислокации, затем производилась декапитация и забор головного мозга для взвешивания и гомогенизации. Мозговая ткань гомогенизировалась механическим способом в гомогенизаторе Поттера-Эльвейма в фосфатно-солевом буфере с pH 7,4 и замораживалась при температуре -20°C . Ткань головного мозга подвергалась двум циклам разморозки/заморозки для усиления лизиса клеток. После окончания последнего цикла гомогенаты центрифугировались при температуре $+2^\circ\text{C}$ и $5000 \times g$, а супернатант отделялся и перемещался в отдельные пробирки [12]. Определение концентрации эритропоэтина и HIF-1 α проводилось методом иммуноферментного анализа на планшетном фотометре «Multiskan Ascent» (ThermoFisher Scientific, Финляндия) с использованием наборов ELISA Kit for HIF1 α (Кат. №SEA798Ra, Cloud-Clone Corp., Houston, USA) и Mouse Erythropoietin Quantikine ELISA Kit (Кат. №MEP00B R&D Systems Inc., Minneapolis, USA). Определение концентрации общего белка в супернатанте производилось биуретовым методом на био-

химическом анализаторе ERBA XL200 (ERBA Lachema co., Чехия).

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью программного пакета Statistics for Windows v11.0. Значимость различий измеряемых параметров оценивалась с помощью непараметрического U-критерия Манна—Уитни. Все показатели были представлены в виде медианы (Me), верхнего и нижнего квартиля (25% и 75%). Достоверными считались различия, для которых уровень p был менее 0,05.

Результаты и обсуждение

Исследование показало, что содержание белка HIF-1 α в ткани головного мозга крыс было выше по отношению к контролю во всех экспериментальных группах (рис. 1). Причем увеличение концентрации HIF-1 α в головном мозге животных, подвергавшихся воздействию гиперкапнической гипоксии, было максимальным. В то же время, увеличение этого параметра в группе НГ было наименьшим среди опытных групп и составило 50% по отношению к контролю. В группах ПГ и ГГ содержание HIF-1 α было выше контрольных значений на 75% и 113% соответственно. Между группами ПГ и ГГ не наблюдалось значимых различий. В то же время, концентрация HIF-1 α в этих группах была больше, чем в группе НГ на 17% и 42% соответственно.

При определении концентрации эритропоэтина в ткани головного мозга крыс наблюдалась сходная

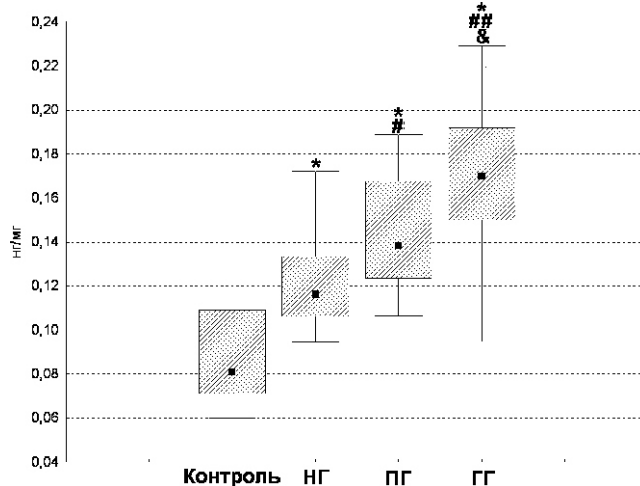


Рис. 1. Концентрация HIF-1 α в ткани головного мозга крыс после 7-кратного воздействия гипоксии и/или гиперкапнии (нг на 1 мг общего белка). НГ — нормобарическая гипоксия; ПГ — пермиссивная гиперкапния; ГГ — гиперкапническая гипоксия; * — различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,001$); # — различия достоверны по сравнению с группой НГ ($p < 0,05$). ## — различия достоверны по сравнению с группой НГ ($p < 0,001$); & — различия достоверны по сравнению с группой ПГ ($p < 0,05$)

динамика (рис. 2). Сочетанное воздействие гипоксии и гиперкапнии вызвало наибольшее увеличение эритропоэтина среди всех опытных групп. Содержание эритропоэтина в группе ГГ было выше, чем в контрольной группе на 98%, на 42% больше по сравнению с группой НГ и на 20% больше, чем в группе ПГ. У животных, подвергавшихся воздействию перmissiveй гиперкапнии, концентрация эритропоэтина в головном мозге возросла на 65% по сравнению с группой контроля и на 18% по сравнению с группой НГ. Повышение содержания эритропоэтина при воздействии нормобарической гипоксии было наименьшим среди опытных групп и составило 40% по отношению к контрольной группе.

Белок HIF-1 α считается ведущим транскрипционным фактором, ответственным за адаптивную реакцию на дефицит кислорода в тканях [13-16]. В условиях нормоксии концентрация кислород-чувствительной субъединицы HIF-1 α поддерживается на низком уровне за счет его инактивации внутриклеточными гидроксилазами [17, 18]. HIF-1 α активирует гены, усиливающие синтез фактора роста эндотелия сосудов и эритропоэтина [19, 20], ремоделирует легочные капилляры [15], ингибирует апоптоз [1] и активирует синтез гликолитических ферментов [21].

По данным настоящего исследования, не смотря на классические представления о природе сигнального механизма активации HIF-1 α , его содержание в головном мозге повышалось не только в условиях дефицита кислорода, но и при воздействии перmissiveй гиперкапнии. Причем, накопление HIF-1 α в присутствии гиперкапнического компонента было намного больше, чем при действии гипоксии. Это свидетельствует о том, что существует альтернативный путь активации HIF-1 α , обусловленный избытком углекислого газа в организме.

Эритропоэтин, помимо стимуляции синтеза эритроцитов, является также и мощным нейропротекторным гликопротеином [2]. Данный эффект является следствием двух процессов: прямого защитного действия на нейроны и поддержания ангиогенного эффекта VEGF [2, 3]. Как было упомянуто ранее, экспрессия эритропоэтина контролируется транскрипционным фактором HIF-1 α , что объясняет сходную динамику концентраций эритропоэтина и HIF-1 α в ткани головного мозга в настоящем эксперименте и подтверждает выдвинутую нами гипотезу.

Таким образом, проведенное исследование позволяет сделать заключение о том, гиперкапния в большей степени, чем гипоксия, стимулирует накопление HIF-1 α и синтез эритропоэтина, что играет важную роль в механизме повышения толерантности мозга к острой гипоксии/ишемии, как при сочетании, так и при изолированном воздействии гиперкапнии.

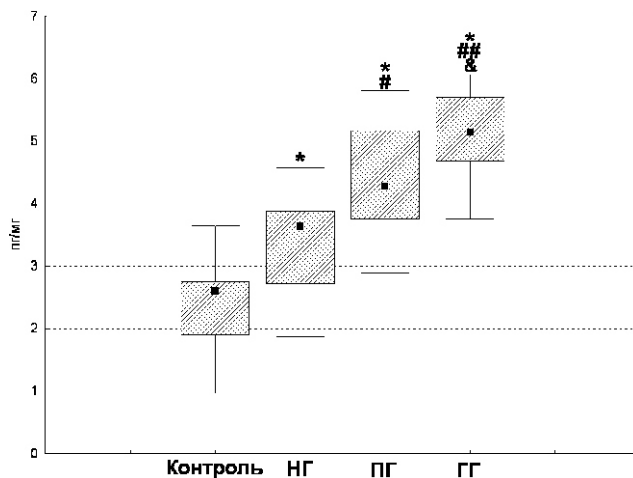


Рис. 2. Концентрация эритропоэтина в ткани головного мозга после 7-кратного воздействия гипоксии и/или гиперкапнии (пг на 1 мг общего белка). НГ – нормобарическая гипоксия; ПГ – перmissiveй гиперкапния; ГГ – гиперкапническая гипоксия; * – различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,001$); # – различия достоверны по сравнению с группой НГ ($p < 0,05$); ## – различия достоверны по сравнению с группой НГ ($p < 0,001$); & – различия достоверны по сравнению с группой ПГ ($p < 0,05$).

Список литературы

- Murphy B.J. Regulation of malignant progression by the hypoxia-sensitive transcription factors HIF-1 α and MTF-1. *Comparative Biochemistry & Physiology*. 2004; 139(3): 495-507.
- Marti H.H., Bernaudin M., Petit E., Bauer C. Neuroprotection and angiogenesis: a dual role of erythropoietin in brain ischemia. *News Physiol. Sci.* 2000; 15: 225-9.
- Sugawa M., Sakurai Y., Ishikawa-Ieda Y., Suzuki, H., Asou H. Effects of erythropoietin on glial cell development; oligodendrocyte maturation and astrocyte proliferation. *Neurosci. Res.* 2002; 44: 391-403.
- Siafakas N.M., Jordan M., Wagner H. et al. Diaphragmatic angiogenic growth factor mRNA responses to increased ventilation caused by hypoxia and hypercapnia. *Eur. Respir. J.* 2001; 17(4): 681-7.
- Kleindienst A., Harvey H.B., Rice A.C. et al. Intraventricular infusion of the neurotrophic protein S100B improves cognitive recovery after fluid percussion injury in the rat. *J. Neurotrauma*. 2004; 21(5): 541-7.
- Lin H.J., Wang C.T., Niu K.C. et al. Hypobaric hypoxia preconditioning attenuates acute lung injury during high-altitude exposure in rats via up-regulating heat-shock protein 70. *Clin. Sci. (Lond)*. 2011; 121(5): 223-31.
- Tregub P., Kulikov V., Bessalov A. Tolerance to acute hypoxia maximally increases in case of joint effect of normobaric hypoxia and permissive hypercapnia in rats. *Pathophysiology*. 2013; 3: 165 – 70.
- Tregub P., Kulikov V., Motin Y., Bessalov A., Osipov I. Combined exposure to hypercapnia and hypoxia provides its maximum neuroprotective effect during focal ischemic injury in the brain. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2015; 24(2): 381- 7.
- Беспалов А.Г., Куликов В.П., Лепилов А.В. Тренировки с гипоксической гиперкапнией как средство увеличения толерантности головного мозга к ишемии. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2004; 3: 60-3.
- Беспалов А.Г., Трегуб П.П., Куликов В.П. и соавт. Роль VEGF, HSP-70 и белка S-100B в механизмах потенцирования гиперкапнией нейропротекторного эффекта гипоксии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2014; 2: 24-7.

11. Jiajun Xua, Zhaoyun Peng, Runping Li, Tonghai Dou, Weigang Xu, Guojun Gu, Yun Liu, Zhimin Kang, Hengyi Tao, John H. Zhang, Robert P. Ostrowski, Jian Lu, Xuejun Sun. Normoxic induction of cerebral HIF-1 by acetazolamide in rats: Role of acidosis. *Neuroscience Letters*. 2009; 451: 274-8.

12. Tanaka T1, Kai S, Koyama T, Daijo H, Adachi T, Fukuda K, Hirota K. General anesthetics inhibit erythropoietin induction under hypoxic conditions in the mouse brain. *PLoS One*. 2011; 6: 12.

13. Ausserer W.A., Bourrat-Floek B., Green C.J., Laderoute K.R., Sutherland R.M. Regulation of c-jun expression during hypoxic and low-glucose stress. *Mol Cell Biol*. 1994;14 (8): 5032-42.

14. Semenza G.L. Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease *Respir Res*. 2000; 1(3): 159-62.

15. Semenza G.L. O2 regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1. *J Appl Physiol*. 2004; 96 (3): 1173-7.

16. Lukyanova L.D. Current issues of adaptation to hypoxia. Signal mechanisms and their role in system regulation. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 2011; 1: 3-19.

17. Wenger, R.H. Cellular adaptation to hypoxia: O2-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O2-regulated gene expression. *FASEB J*. 2002; 16: 1151-62.

18. Lando D, Gorman J.J., Whitelaw M.L., Peet D.J. Oxygen-dependent regulation of hypoxia-inducible factors by prolyl and asparaginyl hydroxylation. *Eur J Biochem*. 2003; 270(5): 781-90.

19. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997; 386: 671-4.

20. Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med*. 2003; 9: 677-84.

21. Chavez J.C., LaManna J.C. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in the rat cerebral cortex after transient global ischemia: Potential role of insulin-like growth factor-1. *J Neurosci*. 2002; 22: 8922-31.

6. Lin H.J., Wang C.T., Niu K.C. et al. Hypobaric hypoxia preconditioning attenuates acute lung injury during high-altitude exposure in rats via up-regulating heat-shock protein 70. *Clin. Sci. (Lond)*. 2011; 121(5): 223-31.

7. Tregub P., Kulikov V., Beshpalov A. Tolerance to acute hypoxia maximally increases in case of joint effect of normobaric hypoxia and permissive hypercapnia in rats. *Pathophysiology*. 2013; 3: 165-70.

8. Tregub P., Kulikov V., Motin Y., Beshpalov A., Osipov I. Combined exposure to hypercapnia and hypoxia provides its maximum neuroprotective effect during focal ischemic injury in the brain. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2015; 24(2): 381-7.

9. Beshpalov A.G., Kulikov V.P., Lepilov A.V. Training with hypoxic hypercapnia as a means to increase the tolerance of brain ischemia. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokirurgiya*. 2004; 3: 60-3. (in Russian)

10. Beshpalov A.G., Tregub P.P., Kulikov V.P. i soavt. The role of VEGF, HSP-70 and protein S-100B potentiating mechanisms hypercapnia neuroprotective effect of hypoxia. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2014; 2: 24-7. (in Russian)

11. Jiajun Xua, Zhaoyun Peng, Runping Li, Tonghai Dou, Weigang Xu, Guojun Gu, Yun Liu, Zhimin Kang, Hengyi Tao, John H. Zhang, Robert P. Ostrowski, Jian Lu, Xuejun Sun. Normoxic induction of cerebral HIF-1 by acetazolamide in rats: Role of acidosis. *Neuroscience Letters*. 2009; 451: 274-8.

12. Tanaka T1, Kai S, Koyama T, Daijo H, Adachi T, Fukuda K, Hirota K. General anesthetics inhibit erythropoietin induction under hypoxic conditions in the mouse brain. *PLoS One*. 2011; 6: 12.

13. Ausserer W.A., Bourrat-Floek B., Green C.J., Laderoute K.R., Sutherland R.M. Regulation of c-jun expression during hypoxic and low-glucose stress. *Mol Cell Biol*. 1994;14 (8): 5032-42.

14. Semenza G.L. Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease *Respir Res*. 2000; 1(3): 159-62.

15. Semenza G.L. O2 regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1. *J Appl Physiol*. 2004; 96 (3): 1173-7.

16. Lukyanova L.D. Current issues of adaptation to hypoxia. Signal mechanisms and their role in system regulation. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 2011; 1: 3-19.

17. Wenger, R.H. Cellular adaptation to hypoxia: O2-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O2-regulated gene expression. *FASEB J*. 2002; 16: 1151-62.

18. Lando D, Gorman J.J., Whitelaw M.L., Peet D.J. Oxygen-dependent regulation of hypoxia-inducible factors by prolyl and asparaginyl hydroxylation. *Eur J Biochem*. 2003; 270(5): 781-90.

19. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997; 386: 671-4.

20. Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med*. 2003; 9: 677-84.

21. Chavez J.C., LaManna J.C. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in the rat cerebral cortex after transient global ischemia: Potential role of insulin-like growth factor-1. *J Neurosci*. 2002; 22: 8922-31.

Поступила 25.03.15

References

1. Murphy B.J. Regulation of malignant progression by the hypoxia-sensitive transcription factors HIF-1 α and MTF-1. *Comparative Biochemistry & Physiology*. 2004; 139(3): 495-507.

2. Marti H.H., Bernaudin M., Petit E., Bauer C. Neuroprotection and angiogenesis: a dual role of erythropoietin in brain ischemia. *News Physiol. Sci*. 2000; 15: 225-9.

3. Sugawa M., Sakurai Y., Ishikawa-Ieda, Y., Suzuki H., Asou H. Effects of erythropoietin on glial cell development; oligodendrocyte maturation and astrocyte proliferation. *Neurosci. Res*. 2002; 44: 391-403.

4. Siafakas N.M., Jordan M., Wagner H. et al. Diaphragmatic angiogenic growth factor mRNA responses to increased ventilation caused by hypoxia and hypercapnia. *Eur. Respir. J*. 2001; 17(4): 681-7.

5. Kleindienst A., Harvey H.B., Rice A.C. et al. Intraventricular infusion of the neurotrophic protein S100B improves cognitive recovery after fluid percussion injury in the rat. *J Neurotrauma*. 2004; 21(5): 541-7.

Сведения об авторах:

Куликов Владимир Павлович, доктор м.н., проф., зав. каф. патофизиологии, ультразвуковой и функциональной диагностики ГБОУ ВПО «Алтайского государственного медицинского университета» Минздрава России

Ковзелев Павел Дмитриевич, студент 4 курса ГБОУ ВПО «Алтайского государственного медицинского университета» Минздрава России

Дорохов Егор Андреевич, студент 4 курса ГБОУ ВПО «Алтайского государственного медицинского университета» Минздрава России

Белоусов А.А., врач клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «Алтайского государственного медицинского университета» Минздрава России

Received 25.03.15

Ветрилэ Л.А.¹, Фомина В.Г.¹, Невидимова Т.И.², Ветлугина Т.П.²,
Батухтина Е.И.², Савочкина Д.Н.², Захарова И.А.¹, Давыдова Т.В.¹

Аутоантитела к глутамату и ГАМК при опиоидной наркомании

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

² — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт психического здоровья»; 634014, г.Томск, ул. Алеутская, д. 4

Исследована сыворотка крови 129 больных опиоидной наркоманией на разных стадиях заболевания и 63 доноров (группа контроля) на наличие аутоантител к возбуждающим и тормозным аминокислотам глутамату и ГАМК. Показана усиленная продукция аутоантител к глутамату и ГАМК у больных с опиоидной наркоманией. Выявлена зависимость уровня и частоты обнаружения аутоантител к глутамату и ГАМК от стадии заболевания.

Ключевые слова: аутоантитела; наркомания; глутамат; ГАМК

Vettrile L.A.¹, Fomina V.G.¹, Nevidimova T.I.², Vetlugina T.P.²,
Batukhtina E.I.², Savochkina D.N.², Zakharova I.A.¹, Davydova T.V.¹

Autoantibodies to glutamate and GABA in opiate addiction

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

² — Mental Health Research institute. 634014, Tomsk, Aleutskaya str. 4. Russia

Blood serum from 129 patients with opium addiction at different stages of the disease and 63 donors (control group) was examined for the presence of autoantibodies to the exciting and inhibitory amino acids glutamate and GABA. It was shown enhanced production of autoantibodies to glutamate and GABA. Dependence of the level and frequency of detection of autoantibodies to glutamate and GABA on the stage of the disease was revealed.

Keywords: autoantibodies; drug addiction; glutamate; GABA

Формирование патологической зависимости от психоактивных веществ связано с изменением функционального состояния ряда структур ЦНС и с нарушением взаимодействия различных нейромедиаторных систем мозга. Фундаментальными исследованиями установлено, что в механизмах развития зависимости от психоактивных веществ ведущую роль играет дофаминергическая нейромедиаторная система, которая берет начало в вентральной области покрышки среднего мозга и проектируется в прилежащем ядре (п. accumbens) переднего мозга и во фронтальной коре [1—4]. Повторные введения морфина или других наркотических веществ вызывают повышение реактивности нервных терминалий в прилежащем ядре (п. accumbens), изменяя высвобождение ряда нейромедиаторов, включая дофамин, ацетилхолин, норадреналин, ГАМК и глутамат [5].

В последнее время многочисленные исследования посвящены изучению роли глутамат- и ГАМКергических нейромедиаторных систем в механизмах развития зависимости от наркотических веществ [2,

6—9]. В механизмах развития аддиктивного поведения вовлечены несколько групп глутаматных рецепторов: ионотропные AMPA-рецепторы, субъединицы NR1 и NR2 NMDA-рецепторов и метаботропные глутаматные рецепторы (mGLUR3, mGLUR5, mGLUR7) [2, 4, 10]. Острое или хроническое введение опиатов вызывало значительное снижение концентрации глутамата в гиппокампе мышей и повышение его содержания в п. accumbens [11]. А в период синдрома отмены морфина, вызванного налоксоном, наоборот, наблюдали существенное увеличение концентрации глутамата и субъединиц NR1 и NR2 NMDA рецептора в разных областях мозга [8, 10, 12] на фоне снижения концентрации ГАМК [6, 8]. Исследования показали, что блокада NMDA и AMPA-рецепторов подавляла внутреннюю систему подкрепления и аддиктивное поведение при применении разных наркотических веществ [12]. Интрацеребровентрикулярное введение антител против NR2B субъединицы NMDA рецептора подавляло активность структур внутреннего вознаграждения, вызванную морфином [13]. В доклинических и клинических исследованиях было установлено, что антагонисты NMDA- и AMPA-рецепторов подавляли развитие и выраженность физической зависимости от наркоти-

Для корреспонденции: Ветрилэ Лучия Александровна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии, e-mail: Vettrile.l@yandex.ru

ков [10, 13, 14]. Антагонист NMDA-рецептора, мепантин, в низких дозах (5 мг/кг) подавлял выраженность симптомов абстинентного синдрома, вызванного налоксоном, а в более высоких дозах (10 мг/кг) полностью блокировал их [15]. Метаботропные глутаматные рецепторы по разному модулируют глутаматную трансмиссию [4, 12]. С помощью фармакологических методов было показано, что снижение глутаматергической передачи посредством блокады метаботропных глутаматных рецепторов группы 1, 2 и 5 привело к существенному подавлению мотивации и внутренней системы вознаграждения и к ослаблению характерных симптомов налоксониндуцированного синдрома отмены у мышей C57Bl/6 для большинства наркотических веществ [4].

Установлено, что ГАМКергическая и опиоидергическая системы взаимодействуют через μ -опиоидные рецепторы [16]. В опытах на крысах было показано, что однократное введение морфина в малых дозах приводило к существенному снижению содержания ГАМК в коре головного мозга [6], к снижению внеклеточной концентрации ГАМК в области дорзального гиппокампа, вентральной области покрышки и околосерогового вещества крыс [17—19]. Снижение содержания ГАМК в дорзальном гиппокампе коррелировало с дефицитом обучения пространственной ориентации у животных [19]. По мнению авторов, снижение содержания ГАМК в структурах мозга происходит за счет увеличения обратного захвата медиатора и в результате увеличения экспрессии транспортеров ГАМК (GAT-1) в гиппокампе. Хроническое введение морфина, наоборот, вызывало увеличение уровня ГАМК в коре головного мозга животных [6, 17, 18]. Введение налоксона за 30 мин до последней инъекции морфина предупреждало увеличение содержания ГАМК в дорзальном гиппокампе у морфинсенситивизированных мышей. В клинических исследованиях у больных опиоидной наркоманией регистрировали устойчивое снижение уровня ГАМК в крови в периодах абстинентного синдрома и становления ремиссии [7].

Наркотическая зависимость — это сложный нейрорепатологический синдром, в формировании которого наряду с центральной нервной системой важная роль принадлежит иммунной системе. Тесная взаимосвязь и взаимодействие центральной нервной и иммунной систем предполагает активное участие иммунной системы в механизмах развития аддиктивного поведения. Одним из аспектов дисрегуляции межсистемных нейроиммунных взаимодействий является усиленная продукция аутоантител к нейромедиаторам и их рецепторам при разных формах патологии ЦНС (чрепно-мозговой травме, болезни Альцгеймера, стрессиндуцированном синдроме) [20—23]. Возможность

усиленной продукции аутоАТ к нейромедиаторам дофамина, серотонину, норадреналину, к глутаматным NMDA- и AMPA-рецепторам и к μ -дельта опиоидным рецепторам показана при различных формах наркотической зависимости в клинике и в условиях экспериментальной опиоидной наркомании [7, 24, 25]. Клиническими исследованиями было показано существенное увеличение уровня аутоантител к NR2A субъединицы NMDA-рецептора в сыворотке крови больных наркоманией в период опиоидного абстинентного синдрома и в период становления ремиссии [7].

Цель настоящей работы — изучить содержание аутоантител к глутамату и ГАМК в сыворотках крови здоровых людей, и лиц страдающих опиоидной наркоманией.

Методика

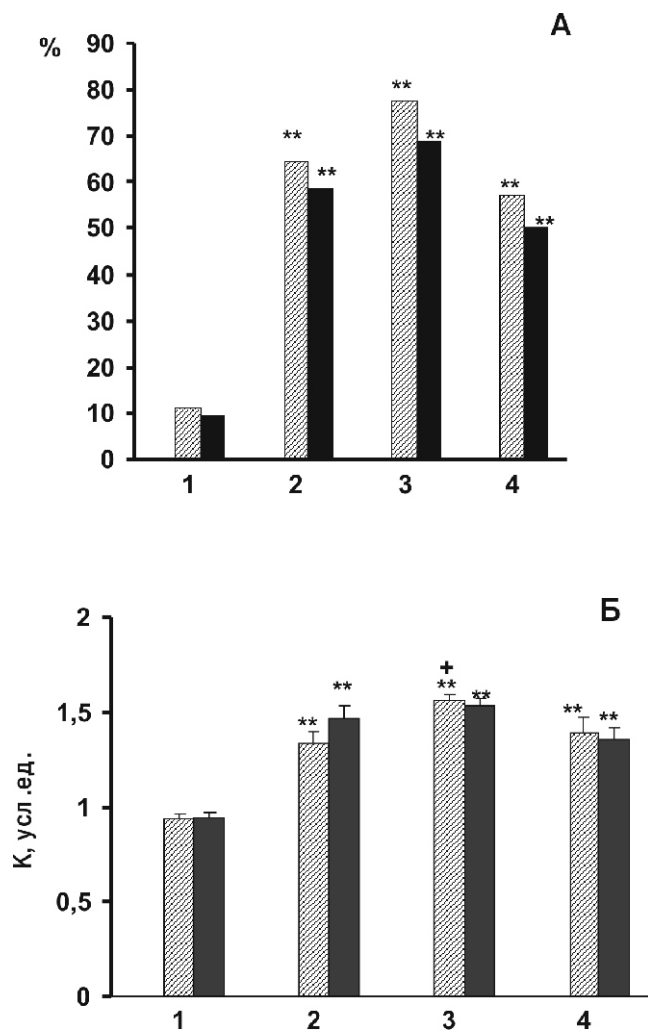
Работа проведена на базе отделения аддиктивных состояний Томского НИИПЗ. Исследована сыворотка крови 129 больных с клиническим диагнозом «Психические и поведенческие расстройства вследствие употребления опиоидов» в возрасте 16—28 лет и с длительностью употребления наркотиков в течение 2—3 лет. Клиническая верификация осуществлялась психиатрами-наркологами в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра (МКБ-10). Критериями включения больных, в группу обследованных явились верифицированный диагноз, письменное информированное согласие пациента на участие в исследовании. Контролем служила сыворотка 63 доноров соответствующего возраста и пола. Для группы сравнения критерием включения были письменное информированное согласие добровольца на участие в исследовании. Критерием исключения были наличие психических расстройств, неврологической патологии, соматических расстройств в стадии обострения. Кровь для исследования у больных и лиц групп сравнения брали однократно.

Аутоантитела к глутамату и ГАМК в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа на полистироловых планшетах, активированных соответствующим тест-антигеном. В качестве тест-антигенов использовали конъюгаты нейромедиаторов (глутамата и ГАМК) с бычьим сывороточным альбумином, синтезированные с использованием бифункционального реагента глутарового альдегида по стандартной методике. В качестве вторичных антител использовали антитела к иммуноглобулинам человека, меченные пероксидазой хрена (МЕДГАМАЛ). Содержание аутоантител оценивали по оптической плотности сыворотки при $\lambda = 492$ нм с использованием считывающего устройства «Mini-reader» («ImmunoChem-2100», USA) и

Уровень аутоантител к глутамату и ГАМК в сыворотках крови здоровых лиц и больных опишной наркоманией

Группа обследованных лиц	Количество обследованных лиц	Уровень (К, усл.ед.) аутоантител к нейромедиаторам	
		Глутамату	ГАМК
Здоровые лица (контроль)	63	0,93 ± 0,03	0,94 ± 0,03
Больные наркоманией	129	1,34 ± 0,04**	1,27 ± 0,04**

Примечание. $p < 0,0001$ по сравнению с группой здоровых лиц.



Частота обнаружения (А) и уровень (Б) аутоантител к глутамату и ГАМК в сыворотке крови больных опишной наркоманией. Столбики с косой штриховкой — аутоантитела к глутамату, темные столбики — аутоантитела к ГАМК.

По оси ординат: А — частота обнаружения аутоантител, %; Б — уровень аутоантител в условных единицах активности (усл.ед.); По оси абсцисс: 1 — здоровые лица; 2 — больные в стадии острой абстиненции; 3 — больные в стадии постабстинентных расстройств; 4 — больные в стадии ремиссии.

** $p < 0,0001$ по сравнению с группой здоровых лиц.

+ $p < 0,03$ по сравнению с группой больных в стадии острых абстинентных расстройств.

выражали в условных единицах активности (усл.ед.) показателем «К», представляющим отношение оптической плотности сыворотки каждого больного к среднему значению оптической плотности сывороток здоровых доноров. Рабочее разведение сыворотки составляло 1:100.

Статистическую обработку данных проводили по программе «Statistica 6.0» с использованием непараметрического критерия Манна—Уитни и точного метода Фишера. Критический уровень значимости (p) принимали равным 0,05

Результаты и обсуждение

Аутоантитела в небольшом количестве выявлялись у всех здоровых лиц. Уровень аутоАТ к глутамату и ГАМК в группе здоровых лиц составил в среднем $0,93 \pm 0,03$ и $0,94 \pm 0,03$ усл.ед. соответственно. Однако у незначительной части из них наблюдали повышенные уровни аутоАТ к глутамату (у 11,1%; $1,35 \pm 0,08$ усл.ед.) и ГАМК (у 9,5%; $1,57 \pm 0,09$ усл.ед.). Это может быть связано с наличием какой-либо скрытой патологии. Больные наркоманией характеризуются более высоким содержанием аутоантител к глутамату и ГАМК (таблица). Частота обнаружения повышенных уровней аутоАТ к исследуемым нейромедиаторам была существенно больше: аутоантитела к глутамату были обнаружены у 74,4% больных, к ГАМК — у 68,2%.

С целью определения возможной патогенетической роли выявляемых аутоАТ все больные были разделены на 3 группы: больные в состоянии острой абстиненции, когда отмена наркотиков составляла несколько суток, ($n = 17$); больные в состоянии постабстинентных расстройств, когда длительность отмены наркотических веществ составляла несколько недель, ($n = 98$) и больные наркоманией в стадии ремиссии ($n = 14$). По количеству выявляемых аутоантител больные всех групп разделились на 2 подгруппы: с высоким (существенно выше значения в группе контроля) и с низким (на уровне контроля) содержанием аутоантител.

Частота обнаружения больных с высоким содержанием аутоантител к исследуемым нейромедиаторам и их уровень представлены на рисунке.

Из приведенных данных видно, что стадия постабстинентных расстройств характеризуются наиболее высоким уровнем аутоантител к глутамату и ГАМК у большинства больных наркоманией (77,5 и 69% соответственно). В период ремиссии наблюдали тенденцию к снижению частоты и уровня аутоантител к исследуемым нейромедиаторам. Такую же тенденцию наблюдали и у больных наркоманией в стадии острой абстиненции: аутоантитела к глутамату были обнаружены у 64,7% больных в количестве $1,34 \pm 0,06$ усл. ед., а к ГАМК — соответственно у 58,8%, их уровень составил $1,46 \pm 0,07$ усл. ед. Полученные данные предполагают рассматривать уровень аутоантител к глутамату и ГАМК как объективный диагностический признак стадии развития заболевания.

Усиленная продукция аутоантител к глутамату и ГАМК на разных стадиях опишной наркомании свидетельствует о вовлеченности иммунной системы в механизмы аддиктивных расстройств и о дисрегуляции нейроиммунных взаимодействий при данной форме патологии. Наиболее существенные изменения (повышение) содержания аутоантител к глутамату и ГАМК наблюдали в период постабстинентных расстройств. Ранее было показано существенное повышение уровней аутоантител к дофамину, норадреналину и серотонию в сыворотке крови больных наркоманией в стадии постабстинентных расстройств, когда длительность отмены наркотических веществ составляла недели [24].

Следует отметить, что этот период характеризуется повышенным уровнем аутоантител к глутаматным NMDA-рецепторам и сниженным содержанием ГАМК в крови больных опишной наркоманией [7]. В опытах на крысах было показано, что увеличение срока отмены наркотика на 7 суток привело к существенному увеличению (на 44,9%) глутамата в коре головного мозга животных на фоне тенденции к снижению концентрации ГАМК [8]. Можно предположить, что увеличение содержания аутоантител к глутамату направлено на включение защитного механизма аутоантител путем связывания свободного глутамата. Экспериментальными исследованиями при стресс-индуцированном синдроме и нейропатическом болевом синдроме на крысах и мышах установлена протективная роль антител к глутамату при их внутрибрюшинном и интраназальном введении [26, 27]. Можно предположить, что различия в содержании аутоантител к глутамату и ГАМК у больных наркоманией на различных стадиях ее развития также могут служить нейроиммунными маркерами прогноза течения заболевания.

Список литературы

1. Анохина И.П. Дисрегуляторные расстройства дофаминовой нейромедиаторной системы при алкоголизме и наркоманиях и их коррекция антидепрессантами. Дисрегуляторная патология. М.: Медицина; 2002.
2. Лелевич В.В., Курбат М.Н., Лелевич С.В. Нейромедиаторные механизмы опиатной наркомании (обзор литературы). Журнал ГрГМУ. 2006; 3: 12-5.
3. Kalivas PW, Volkow ND. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. Am J Psychiatry. 2005; 162: 1403-3.
4. Xia Li, Zheng-Xiong Xi, Athina Markou. Metabotropic Glutamate 7 (mGlu7) Receptor: A Target for Medication Development for the Treatment of Cocaine Dependence. Neuropharmacology. 2013; 66: 12-23.
5. Schoffelmeer A., Wardeh G., Vanderschuren L. Morphine acutely and persistently attenuates nonvesicular GABA release in rat nucleus accumbens. Synapse. 2001; 42: 87-94.
6. Курбат М.Н., Лелевич В.В. Особенности метаболизма нейроактивных аминокислот в коре большого мозга крыс при интоксикации морфином. Бюлл. эксперим. биол. и мед. 2002; 65 (5): 27-8.
7. Востряков В.В. Активность MAO-B, уровни ГАМК и аутоантител к глутаматным и опиатным рецепторам в крови при медикаментозном лечении больных алкоголизмом и опишной наркоманией. Автореферат дисс... канд. мед. наук. Санкт-Петербург; 2004.
8. Винницкая А.Г., Лелевич С.В., Лелевич В.В., Козловский А.В., Дорошенко Е.М. Особенности обмена ГАМК и нейроактивные аминокислоты в головном мозге белых крыс в динамике морфинового абстинентного синдрома. Биомедицинская химия. 2007; 53(4): 427-34.
9. Kalivas PW, Lalumiere RT, Knackstedt L, Shen H. Glutamate transmission in addiction. Neuropharmacology. 2009; 56 (Suppl): 169-17.
10. Noda Y., Nabeshima T. Opiate physical dependence and N-methyl-D-aspartate receptors. Eur.J.Pharmacol. 2004; 500 (1-3): 121-8.
11. Guo M, Hu J., Yang N., Wu C., Pei G. Morphine modulates glutamate release in the hippocampal CA1 area in mice. Neurosci. Lett. 2005; 381 (1-2): 12-5.
12. Xia Li, Jie Li, Gardner E., Xi Z. Activation of mGluR7s inhibits cocaine-induced reinstatement of drug seeking behavior by a nucleus accumbens glutamate-mGluR2/3 mechanism in rats. J. Neurochem. 2010; 114(5): 1368-80.
13. Narita M., Aoki T., Suzuki T. Mechanisms of morphine-induced rewarding effect: involvement of NMDA receptor subunits. Nippon Yakurigaku Zasshi. 2001; 117(1): 13-9.
14. Palucha-Poniewiera A., Novak K., Pilc A. Group III mGlu receptor agonist, ACPT-1, attenuates morphine-withdrawal symptoms after peripheral administration in mice. Biol.Psychiatry. 2009; 33(8): 454-7.
15. Harris A.C., Rothwell P.E., Gewirtz J.C. Effect of the NMDA receptor antagonist memantine on the expression and development of acute opiate dependence as assessed by withdrawal-potentiated startle and hyperalgesia. Psychopharmacology (Berl.). 2008; 196(4): 649-60.
16. Xi Z., Stein E. GABAergic mechanisms of opiate reinforcement. Alcohol Alcohol. 2002; 37: 485-94.
17. Farahmandfar M., Zarrindast M., Kadivar M., Karimian S., Naghdi N. The effect of morphine sensitization on extracellular concentrations of GABA in dorsal hippocampus of male rats. European Journal of Pharmacology. 2011; 669: 66-70.

Работа поддержана грантом РГНФ
№ 12-06-00673

18. Gao H., Xiang Y., Sun N., Wang Y., Liu M., Lei H. Metabolic changes in rat prefrontal cortex and hippocampus induced by chronic morphine treatment studied ex vivo by high resolution 1H NMR spectroscopy. *Neurochem.* 2007; 50: 386-94.

19. Hu J., Yang N., Ma Y., Zhou X., Zhang X., Jang J. et al. Decrease of morphine- induced reward effects and withdrawal symptoms in mice over expressing gamma-aminobutyric acid transporter 1. *J. Neurosci.Res.* 2003; 74: 614-21.

20. Евсеев В.А. Нейроиммунология. Нейроиммунопатология. Перспективы иммунотерапии. Патогенез. 2008; 2:4-8.

21. Сорокина Е.Г., Семенова Ж.Б., Базарная Н.А., Мещеряков С.В., Реутов В.П., Горюнова А.В., Пинеллис В.Г., Гранстрем О.К., Рошаль Л.М. Аутоантитела к рецепторам глутамата и продукты метаболизма оксида азота в сыворотке крови детей в остром периоде черепно-мозговой травмы. . 2008; 108 (): 67-72.

22. Ветрилэ Л.А., Умрюхин А.Е., Кравцов А.Н., Сотников С.В., Захарова И.А. Аутоантитела к нейромедиаторам при психо-эмоциональном стресс-синдроме. Патогенез. 2008; 2:38.

23. Давыдова Т.В. Колобов В.В., Горбатов В.Ю., Захарова И.А., Ветрилэ Л.А., Фомина В.Г., Феденко А.М. Антитела к глутамату, нейродегенеративные повреждение головного мозга. Перспективы иммунотерапии. Патогенез. 2012; 10 (3): 26-9.

24. Давыдова Т.В., Ветрилэ Л.А., Ветлугина Т.П., Невидимова Т.И., Бохан Н.А., Батухтина Е.И. и др. Антитела к нейромедиаторам как возможные нейроиммунные маркеры риска формирования зависимости от психоактивных веществ. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2013; 2: 13-6.

25. Capone F., Adriani W., Shumilina M., Izykenova G., Granstrom O., Dambinova S. et al. Autoantibodies against opioid or glutamate receptors are associated with changes in morphine reward and physical dependence in mice. *Psychopharmacology (Berl.)*. 2008; 197(4): 535-48.

26. Игонькина С.И., Ветрилэ Л.А. Иммуномодуляция невропатической боли. Патогенез. 2010; 1: 42.

27. Ветрилэ Л.А., Захарова И.А., Кудрин В.С., Клодт П.М. Нейромодулирующее влияние антител к глутамату на поведенческие реакции и уровень нейромедиаторов в ЦНС у крыс при иммобилизационном стрессе. Патогенез. 2012; 3: 30-40.

Поступила 29.06.15

References

1. Anokhina I.P. *Dizregulatory disorders of the dopamine neurotransmitter systems in alcoholism and drug addiction and their antidepressant's correction.* M.: Meditsina; 2002. (in Russian)

2. Lelevich V.V., Kurbat M.N., Lelevich S.V. Neurotransmitter mechanisms of opiate addiction (review). *Zhurnal GrGMU.* 2006; 3: 12-5. (in Russian)

3. Kalivas PW, Volkow ND. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry.* 2005; 162: 1403-13.

4. Xia Li, Zheng-Xiong Xi, Athina Markou. Metabotropic Glutamate 7 (mGlu7) Receptor: A Target for Medication Development for the Treatment of Cocaine Dependence. *Neuropharmacology.* 2013; 66: 12-23.

5. Schoffelmeer A., Wardeh G., Vanderschuren L. Morphine acutely and persistently attenuates nonvesicular GABA release in rat nucleus accumbens. *Synapse.* 2001; 42: 87-94.

6. Kurbat M.N., Lelevich V.V. Features metabolism of neuroactive amino acids in the cerebral cortex of rats with morphine intoxication. *Byull.eksperim. biol. i med.* 2002; 65 (5): 27-8. (in Russian)

7. Vostryakov V.V. *MAO-B activity, the levels of GABA and glutamate, and autoantibodies to opiate receptors in the blood in medical treatment of patients with alcoholism and opiate addiction.* Avtoreferat diss... kand. med. nauk. Sankt-Peterburg; 2004. (in Russian)

8. Vinnitskaya A.G., Lelevich S.V., Lelevich V.V., Kozlovskiy A.V., Doroshenko E.M. Properties GABA metabolism and neuroactive amino acids in the brain white rats in dynamics of morphine withdrawal syndrome. *Biomeditsinskaya khimiya.* 2007; 53(4): 427-34. (in Russian)

9. Kalivas PW, Lalumiere RT, Knackstedt L, Shen H. Glutamate transmission in addiction. *Neuropharmacology.* 2009; 56 (Suppl): 169-17.

10. Noda Y., Nabeshima T. Opiate physical dependence and N-methyl-D-aspartate receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 2004; 500 (1-3): 121-8.

11. Guo M, Hu J., Yang N., Wu C., Pei G. Morphine modulates glutamate release in the hippocampal CA1 area in mice. *Neurosci. Lett.* 2005; 381 (1-2): 12-5.

12. Xia Li, Jie Li, Gardner E., Xi Z. Activation of mGluR7s inhibits cocaine-induced reinstatement of drug seeking behavior by a nucleus accumbens glutamate-mGluR2/3 mechanism in rats. *J. Neurochem.* 2010; 114(5): 1368-80.

13. Narita M., Aoki T., Suzuki T. Mechanisms of morphine-induced rewarding effect: involvement of NMDA receptor subunits. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 2001; 117(1): 13-9.

14. Palucha-Poniewiera A., Novak K., Pilc A. Group III mGlu receptor agonist, ACPT-1, attenuates morphine-withdrawal symptoms after peripheral administration in mice. *Prog. Neuro psychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2009; 33(8): 454-7.

15. Harris A.C., Rothwell P.E., Gewirtz J.C. Effect of the NMDA receptor antagonist memantine on the expression and development of acute opiate dependence as assessed by withdrawal-potentiated startle and hyperalgesia. *Psychopharmacology (Berl.)*. 2008; 196(4): 649-60.

16. Xi Z., Stein E. Gabaergic mechanisms of opiate reinforcement. *Alcohol Alcohol.* 2002; 37: 485-94.

17. Farahmandfar M., Zarrindast M., Kadivar M., Karimian S., Naghdi N. The effect of morphine sensitization on extracellular concentrations of GABA in dorsal hippocampus of male rats. *European Journal of Pharmacology.* 2011; 669: 66-70.

18. Gao H., Xiang Y., Sun N., Wang Y., Liu M., Lei H. Metabolic changes in rat prefrontal cortex and hippocampus induced by chronic morphine treatment studied ex vivo by high resolution 1H NMR spectroscopy. *Neurochem.* 2007; 50: 386-94.

19. Hu J., Yang N., Ma Y., Zhou X., Zhang X., Jang J. et al. Decrease of morphine- induced reward effects and withdrawal symptoms in mice overexpressing gamma-aminobutyric acid transporter 1. *J. Neurosci.Res.* 2003; 74: 614-21.

20. Evseev V.A. Neuroimmunology. Neuroimmunopathology. Prospects for immunotherapy. *Patogenez.* 2008; 2: 4-8. (in Russian)

21. Sorokina E.G., Semenova Zh.B., Bazarnaya N.A., Meshcheryakov S.V., Reutov V.P., Goryunova A.V., Pine-

lis V.G., Granstrem O.K., Roshal' L.M. Autoantibodies to glutamate receptors and nitric oxide metabolites in the blood serum of children with acute traumatic brain injury. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. C.C. Korsakova*. 2008; 108 (3): 67-72. (in Russian)

22. Vetrile L.A., Umryukhin A.E., Kravtsov A.N., Sotnikov S.V., Zakharova I.A. Autoantibodies to neurotransmitters in the psycho-emotional stress syndrome. *Patogenez*. 2008; 2:38. (in Russian)

23. Davydova T.V., Kolobov V.V., Gorbatov V.Yu., Zakharova I.A., Vetrile L.A., Fomina V.G., Fedenko A.M. Antibodies to glutamate, neurodegenerative brain damage. Prospects for immunotherapy. *Patogenez*. 2012; 10 (3): 26-9. (in Russian)

24. Davydova T.V., Vetrile L.A., Vetlugina T.P., Nevidimova T.I., Bokhan N.A., Batukhtina E.I. et al. Antibodies to neurotransmitters as possible neuroimmune risk markers of

formation dependence to psychoactive substances. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2013; 2: 13-6. (in Russian)

25. Capone F., Adriani W., Shumilina M., Izykenova G., Granstrem O., Dambinova S. et al. Autoantibodies against opioid or glutamate receptors are associated with changes in morphine reward and physical dependence in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008; 197(4): 535-48.

26. Igon'kina S.I., Vetrile L.A. Immunomodulation of neuropathic pain. *Patogenez*. 2010; 1: 42. (in Russian)

27. Vetrile L.A., Zakharova I.A., Kudrin V.S., Klodt P.M. Neuromodulating influence of glutamate antibodies on the behavioral response and the level of neurotransmitters in the central nervous system in rats during immobilization stress. *Patogenez*. 2012; 3: 30-40. (in Russian)

Received 29.06.15

Сведения об авторах:

Фомина Валентина Гавриловна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ НИИ ОПП

Невидимова Татьяна Ивановна, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. клинической психонейроиммунологии ФГБНУ НИИПЗ

Ветлугина Тамара Парфёновна, доктор биол. наук, засл. деятель науки РФ, зав. отделом биологической психиатрии ФГБНУ НИИПЗ

Батухтина Елена Ивановна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. клинической психонейроиммунологии ФГБНУ НИИПЗ

Савочкина Дарья Николаевна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. клинической психонейроиммунологии ФГБНУ НИИП

Захарова Ирина Александровна — канд. биол. наук, ст.н.с. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ НИИ ОПП

Давыдова Татьяна Викторовна, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ НИИ ОПП

Бохан Н.А., Невидимова Т.И.

Взаимосвязь уровня половых гормонов, реакции на феромоны и продукции интерлейкинов с риском формирования наркотической зависимости

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

Исследованы содержание сывороточных стероидных гормонов и продукция провоспалительных цитокинов у 109 лиц с зависимостью от психоактивных веществ (ПАВ), 34 эпизодических потребителей ПАВ и 78 контрольных лиц. Гендерную незрелость как фактор риска формирования наркотической зависимости, ассоциированной с инфекционно-воспалительными процессами, оценивали с помощью ольфакторных реакций на феромоны.

Ключевые слова: цитокины; половые гормоны; феромоны; гендер

Bokhan N.A., Nevidimova T.I.

Relationship between sex hormones, pheromones, interleukine production and risk of drug dependence

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

Serum steroid hormones and production of proinflammatory cytokines in 109 individuals with substance dependence, 34 occasional users and 78 control subjects were examined. Immaturity of gender as a risk factor for the formation of drug dependence associated with infectious and inflammatory processes was estimated by olfactory pheromone tests.

Keywords: cytokines; hormones; pheromones; gender

Формирование болезней зависимости в подростковой популяции во многом определяется гендерными параметрами, к которым относят биологический пол, ценностные ориентации, сексуальный опыт, социальный статус. С нарушением этих параметров связывают поведенческие девиации и раннюю тропность к аддиктивному поведению [1, 2]. Степень сексуальной зрелости может быть косвенно оценена не только по уровню половых гормонов, но по реакции на их летучие метаболиты — феромоны [3]. Хемосигналы, восприятие которых осуществляется с участием лимбической системы и ассоциировано с механизмами иммунного распознавания, модулируют социальное, сексуальное, репродуктивное поведение человека [4, 5]. Стероидные гормоны являются одними из ключевых регуляторов иммунных и воспалительных процессов, роль которых в патогенезе наркотической зависимости несомненна [5]. В настоящее время представления о том, что андрогены и кортикостероиды обладают иммунодепрессивным действием, а эстрогены — иммуностимулирующим, претерпевают изменения.

Цель настоящей работы — изучить влияние сывороточных стероидных гормонов на ольфакторное

восприятие их летучих метаболитов и продукцию провоспалительных цитокинов при эпизодическом и систематическом употреблении психоактивных веществ.

Методика

На базе НИИ психического здоровья (Томск) обследовано 109 пациентов с зависимостью от ПАВ (F1x.2 по МКБ-10), 34 эпизодических потребителя ПАВ и 78 условно здоровых лиц (контроль) обоего пола в возрасте 17—25 лет. Критериями включения для пациентов был указанный возраст, верифицированный диагноз. Критериями исключения было наличие эндогенных психических расстройств и умственной отсталости, коморбидных неврологических и соматических заболеваний в стадии обострения. Критериями включения для эпизодических потребителей ПАВ был указанный возраст, отсутствие ритма потребления и активного поиска ПАВ, критериями исключения — наличие психических расстройств, неврологических и соматических заболеваний в стадии обострения.

Выявляли клинические признаки иммунной недостаточности, а именно инфекционный и аллергический синдромы, выраженность которых оценивали в баллах. Эмоциональное отношение к запахам андростенона и эстратетраендиола («Sigma») оценивали в условных единицах с помощью визуально-аналоговой шкалы: на-

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

личие аверсивной реакции на одоранты диагностировали при выборе испытуемым отметки на шкале от 6 до 10. Оценивали маскулинность/фемининность с помощью гендерного индекса. Продукцию фактора некроза опухоли (ФНО- α) и интерлейкинов (ИЛ-6 и ИЛ-1 β) иммунокомпетентными клетками исследовали в культуре цельной крови, стимулированной липополисахаридом («Sigma»). Концентрацию цитокинов в супернатантах культуры, а также концентрацию кортизола, тестостерона, эстрадиола в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием стандартных наборов реактивов ООО «Протеиновый контур», «Алкор Био», «Хема» (Россия). При проведении исследования были соблюдены принципы информированного согласия Хельсинкской декларации Все-

мирной медицинской ассоциации. Статистическая обработка осуществлялась с использованием критерия Манна—Уитни, F -преобразования Фишера, коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

Общими для зависимых от ПАВ лиц мужского и женского пола являются следующие признаки: повышение уровня кортизола, продукции ИЛ-6 и клинических признаков иммунной недостаточности. В группах зависимых от ПАВ лиц уровень половых гормонов снижен лишь в виде тенденции, гендерный индекс также не отличается от такового в группах сравнения, но именно для этих лиц характерны аверсивные реакции на феромоны (таблица).

Таблица

Имунофизиологические параметры зависимых от ПАВ лиц, эпизодических потребителей ПАВ и контрольной группы (медиана, в скобках квантили)

Показатели		Пол	Контрольная группа (n = 78)	Эпизодические потребители ПАВ (n = 34)	Зависимые от ПАВ лица (n = 109)
ФНО- α , пг/мл		м	727,7 (576,8; 845,1)	820,3 (535,7; 1009,6)	631,5 (430,23; 901,9)
		ж	700,0 (500,0; 1100,0)	461,1 (266,0; 2439,8)	428,7 (417,4; 686,0)*
ИЛ-6, пг/мл		м	2339,0 (1852,4; 2562,0)	2413,7 (2073,8; 2628,9)	3281,3 * # (2446,5; 3824,0)
		ж	2970,5 (2358,0; 3824,0)	3880,0 (3880,0; 3880,0)	3333,6 (2560,3; 3546,0)
ИЛ-1 β , пг/мл		м	219,8 (201,6; 303,9)	230,3 (203,5; 456,5)	221,5 (217,7; 473,0)
		ж	223,0 (214,2; 384,0)	206,3 * (198,5; 221,5)	217,0 (86,7; 236,5)
Иммунная недостаточность, балл		м	0,0 (0,0; 0,75)	0,5 * (0,0; 1,5)	1,5 * # (0,5; 2,0)
		ж	0,5 (0,0; 1,5)	1,5 (0,5; 1,5)	2,0* # (0,5; 2,0)
Кортизол, нмоль/л		м	445,9 (328,2; 600,1)	494,5 (395,7; 578,2)	543,1 * (326,3; 760,3)
		ж	571,4 (408,0; 801,8)	312,2 * (272,2; 467,3)	760,3 * # (560,8; 1062,2)
Половые гормоны, нмоль/л	Тестостерон	м	21,9 (14,1; 27,3)	20,8 (14,3; 28,4)	18,0 (12,9; 24,7)
	Эстрадиол	ж	0,304 (0,195; 0,437)	0,181 (0,157; 0,240)	0,219 (0,137; 0,295)
Аверсия на феромон, усл.ед.	Андростенон	м	4,0 (2,0; 7,0)	4,0 (2,0; 7,0)	7,0 * # (4,0; 10,0)
	Эстратетрадиенон	ж	3,8 (2,0; 4,0)	4,0 (2,0; 6,0)	4,0 (2,0; 7,0)
Гендерный индекс		м	0,01 (0,07; 0,07)	0,05 (0,11; 0,04)	0,02 (0,09; 0,07)
		ж	3,8 (2,0; 4,0)	4,0 (2,0; 6,0)	4,0 (2,0; 7,0)

Примечание. * — $p < 0,05$ при сравнении с контролем; # — $p < 0,05$ при сравнении с группой эпизодических потребителей ПАВ.

Реакция отвращения на запах андростенона зафиксирована у 72,0% зависимых от ПАВ лиц мужского пола (в контроле 17,1%, $p < 0,01$), на запах эстратетраендиола — у 33,3% зависимых от ПАВ лиц женского пола (в контроле — 7,0%, $p < 0,05$, вне зависимости от фазы менструального цикла). Только в подгруппах зависимых от ПАВ лиц выявлены слабые, но статистически значимые отрицательные корреляционные взаимосвязи между уровнем тестостерона и ИЛ-6, уровнем эстрадиола и ИЛ-1. Поскольку у лиц, эпизодически употребляющих ПАВ и относящихся к группе риска, аналогичных взаимосвязей не выявлено, на настоящем этапе исследования нельзя сделать однозначный вывод о причинно-следственных связях между изученными параметрами.

Гендерные стереотипы юношей, больных наркоманией, часто соответствуют представлениям о маскулинности, принятым в криминально-маргинальной среде. Гендерные стереотипы девушек чаще ориентированы на традиционные фемининные паттерны социального поведения. Вместе с тем, к факторам, повышающим риск химической аддикции, относят трудный пубертат с психическим инфантилизмом. У значительного большинства подростков, страдающих опиоидной зависимостью, нарушаются темпы психосексуального развития, наблюдаются девиации пололевого поведения — от гипермаскулинного до фемининного [1]. У юношей они могут быть связаны с недостатком тестостерона, в том числе опиоид-индуцированным [5]. Эстроген-зависимость подкрепляющих и «гедонических» эффектов психоактивных веществ является важной составляющей факторов риска аддиктивных расстройств, ассоциированных с полом [2]. Чувствительность женщин к феромональным запахам повышается в середине цикла, то есть в овуляцию [4]. Аверсивные реакции на андростенон чаще наблюдаются у лиц женского пола, а также у детей и подростков препубертатного возраста вне зависимости от пола. Юноши постпубертатного возраста утрачивают аверсивную реакцию по мере взросления (предположительно из-за десенситизации рецепторов в связи с нарастанием уровня эндогенных метаболитов тестостерона) [3, 5].

Таким образом, гендерная незрелость как фактор риска формирования наркотической зависимости, ассоциированной с инфекционно-воспалительными про-

цессами, может быть оценена с помощью ольфакторных тестов.

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

Список литературы

1. Bokhan N.A., Baturin E.V. Gender Heteronomy of the Formation of Heroin Addiction in Adolescents. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2011; 41: 710-4.
2. Hu M., Crombag H.S., Robinson T.E., Becker J.B. Biological basis of sex differences in the propensity to self-administer cocaine. *Neuropsychopharmacology*. 2004; 29(1): 81-5.
3. Hummel T., Krone F., Lundstrom J.N., Bartsch O. Androstadienone odor thresholds in adolescents. *Horm Behav*. 2005; 47 (3): 306-10.
4. Grammer K, Fink B, Neave N. Human pheromones and sexual attraction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2005; 118 (2): 135-42.
5. Невидимова Т.И., Батухтина Е.И., Ветлугина Т.П., Савочкина Д.Н., Никитина В.Б., Бохан Н.А. Сопряженность продукции цитокинов с уровнем гормонов и сенсорными реакциями при формировании зависимости от психоактивных веществ у лиц мужского пола. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015; 159 (6): 744-8.

Поступила 29.06.15

References

1. Bokhan N.A., Baturin E.V. Gender Heteronomy of the Formation of Heroin Addiction in Adolescents. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2011; 41: 710-4.
2. Hu M., Crombag H.S., Robinson T.E., Becker J.B. Biological basis of sex differences in the propensity to self-administer cocaine. *Neuropsychopharmacology*. 2004; 29(1): 81-5.
3. Hummel T., Krone F., Lundstrom J.N., Bartsch O. Androstadienone odor thresholds in adolescents. *Horm Behav*. 2005; 47 (3): 306-10.
4. Grammer K, Fink B, Neave N. Human pheromones and sexual attraction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2005; 118 (2): 135-42.
5. Nevidimova T.I., Batukhtina E.I., Vetlugina T.P., Savochkina D.N., Nikitina V.B., Bokhan N.A. Association between cytokine production, level of hormones and sensory reactions in the formation of substance dependence in males. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny*. 2015; 159 (6): 744-8. (In Russian)

Received 29.06.15

Сведения об авторах:

Бохан Николай Александрович, доктор мед. наук, проф., член-корр. РАН, заслуженный деятель науки РФ, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт психического здоровья», e-mail: redo@mail.tomsknet.ru

Юматов Е.А.¹, Перцов С.С.^{2,3}, Дудник Е.Н.^{1,2}, Крамм М.Н.⁴, Стрелков Н.О.⁴

Контроль физиологических функций человека во время повседневного ночного сна

- ¹ — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
- ² — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8
- ³ — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова Минздрава России, 127473, Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1
- ⁴ — Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Национальный исследовательский университет «Московский энергетический институт», 111250, Москва, ул. Красноказарменная, д. 14

Широко используемая в настоящее время классическая сомнологическая методология ориентирована только на клиническое применение и не может быть использована в повседневных домашних условиях для контроля физиологических функций во время естественного сна. Целью работы явилось создание информационно-аппаратурной системы, осуществляющей контроль физиологических функций человека во время сна в реальной повседневной жизни. Информационный комплекс представляет собой совершенно новое портативное микропроцессорное устройство и оригинальное программное обеспечение, реализуемое на персональном компьютере, для контроля жизненно важных физиологических функций во время сна в реальной повседневной жизни. Для объективного анализа сна в реальных повседневных условиях разработана методология, позволяющая производить контроль фазовой структуры сна, сердечно-сосудистых функций и дыхания на основе кросскорреляционного анализа сердечного ритма и частоты дыхания, который отражает степень развития эмоционального напряжения. Информационная система для контроля сна в бытовых условиях состоит из взаимосвязанных блоков, осуществляющих: регистрацию, идентификацию и анализ фазовой структуры сна; пробуждения в фиксированное время и в выбранную оптимальную для психофизиологического состояния фазу сна; прерывания затянувшейся опасной для жизни фазы сна. Благодаря комплексному анализу физиологических функций, информационная система позволит контролировать сон в реальной повседневной жизни, а также прерывать опасные для жизни фазы сна, которые могут сопровождаться выраженными сердечно-сосудистыми нарушениями, приводящими к мозговому инсульту, инфаркту миокарда и внезапной смерти.

Ключевые слова: сон; информационная медицина; медицинская аппаратура; жизненно важные функции

Yumatov E.A.¹, Pertsov S.S.^{2,3}, Dudnik E.N.^{1,2}, Kramm M.N.⁴, Strelkov N.O.⁴

Monitoring of human physiological functions during the daily night sleep

- ¹ — I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya St. 8-2, Moscow, 119991, Russia
- ² — Federal State Scientific Institution «P.K. Anokhin Research Institute of Normal Physiology», Baltiiskaya St. 8, Moscow, 125315, Russia
- ³ — A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Delegatskaya St. 20-1, Moscow, 127473, Russia
- ⁴ — National Research University «Moscow Power Engineering Institute», Krasnokazarmennaya St. 14, Moscow, 111250, Russia

The basic somnological methodology, which is extensively used in the present time, focuses only on clinical practice. However, this approach is not appropriate for monitoring of physiological functions during natural sleep under home conditions. Our work was designed to develop a new information-and-equipment device for the reliable study of human physiological functions during sleep in the real everyday life. The information complex is a new portable microprocessor device and original software, which is constructed on the basis of PC and provides a control of vital physiological functions during sleep in the real everyday life. We developed a new methodology for the objective comprehensive study of sleep under real day-to-day conditions. This approach allows us to identify the phase structure of sleep and to control cardiovascular functions and breathing on the basis of a cross-correlation analysis of the heart rate and respiratory rate (that reflects the degree of emotional strain). The information system for control of sleep under living conditions is composed from interrelated units, which perform the following functions: registration, identification, and analysis of the phase structure of sleep; wake-up of a subject in a certain time during the pre-determined optimal phase of sleep (as regards the psychophysiological state of this subject); and interruption of a long-lasting hazardous phase of sleep. Due to a complex analysis of physiological functions, the information system provides monitoring of sleep under real living conditions and interruption of hazardous phases of sleep that can be accompanied by serious cardiovascular disorders (i.e., leading to cerebral stroke, myocardial infarction, and sudden death).

Keywords: sleep; information medicine; medical equipment; vital functions

Для корреспонденции: Юматов Евгений Антонович, доктор мед. наук, проф., акад. Международной академии наук, проф. каф. нормальной физиологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, проф. каф. основ радиотехники Национального исследовательского университета «МЭИ», e-mail: eayumatov@mail.ru

Сон является важной составной частью жизнедеятельности человека, от которого зависит жизнь, здоровье, трудоспособность, интеллектуальная деятельность, психоэмоциональное состояние, устойчивость к эмоциональному стрессу [1—4].

Как известно, нормальный физиологический сон характеризуется рядом последовательно сменяющихся друг друга фаз, каждая из которых имеет определенное биологическое значение и проявляется в электроэнцефалограмме (ЭЭГ), движении глаз, мышечном тоне и изменении ряда вегетативных функций. Внедрение в практику полисомнографии открыло широкие возможности для изучения фазовой структуры и

разработки нормативных критериев ночного сна человека, а также выяснения роли сна как фактора адаптации к стрессу в системе «человек — среда».

В настоящее время исследования сна проводятся в стационарных, клинических условиях с помощью современного комплексного обследования, включающего психологическое и психомоторное тестирование, регистрацию фазовой структуры ночного сна и вегетативных функций.

Анализ и распознавание различных фаз ночного сна осуществляется на основе: анализа ЭЭГ, движения глаз, электроокулограммы (ЭОГ), вегетативных функций, в частности, электрокардиограммы (ЭКГ),



Рис. 1. Структура информационно-аппаратурного комплекса для контроля физиологических функций во время повседневного ночного сна: блок корреляционного анализа сердечного ритма и частоты дыхания (А); блок контроля и анализа фаз сна, пробуждения в выбранную фазу сна прерывания опасной фазы сна (Б); блок охранной сигнализации нарушения сердечного ритма (В).

дыхания, артериального давления (АД), моторной активности и мышечного тонуса.

В многочисленных исследованиях была установлена взаимосвязь между психоэмоциональным, характерологическим статусом личности, уровнем эмоционального напряжения, циклом «сон—бодрствование», «качеством» ночного сна, его фазовой структурой. Выявлены индивидуальные особенности фазовой структуры сна, связанные с предрасположенностью к различным заболеваниям: невротическим, сердечно-сосудистым, желудочно-кишечным и пр. Характерно, что во время ночного сна наиболее рано проявляются предвестники указанных невротических заболеваний [3, 5—7].

Однако при всей медико-социальной значимости до сих пор не представляется возможным изучение физиологических функций человека во время сна в реальных повседневных бытовых условиях.

Цель исследования — разработка современных методов контроля сна и диагностики различных жизненно важных функций во время естественного ночного сна.

Результаты и обсуждение

Информационно-аппаратурный комплекс для контроля физиологических функций человека во время повседневного ночного сна состоит из блоков регистрации фаз сна, электрокардиограммы (ЭКГ) и частоты дыхания (ЧД), для которых разработаны специальные программы для кросскорреляционного анализа ритма сердца и дыхания и фаз ночного сна (рис. 1) [8].

В информационно-аппаратурном комплексе для контроля сна человека в повседневных бытовых условиях использована регистрация электроэнцефалограммы (ЭЭГ), электроокулограммы (ЭОГ), частоты дыхания (ЧД), электрокардиограммы (ЭКГ).

Информационная система для контроля физиологических функций во время сна в повседневных условиях осуществляет: идентификацию и анализ фазовой структуры сна, прерывание затянувшейся опасной фазы сна; контроль ритма сердца и дыхания; проводит кросскорреляционный анализ сердечного ритма и частоты дыхания, характеризующий состояние эмоционального напряжения; отображает и анализирует все результаты на персональном компьютере (ПК).

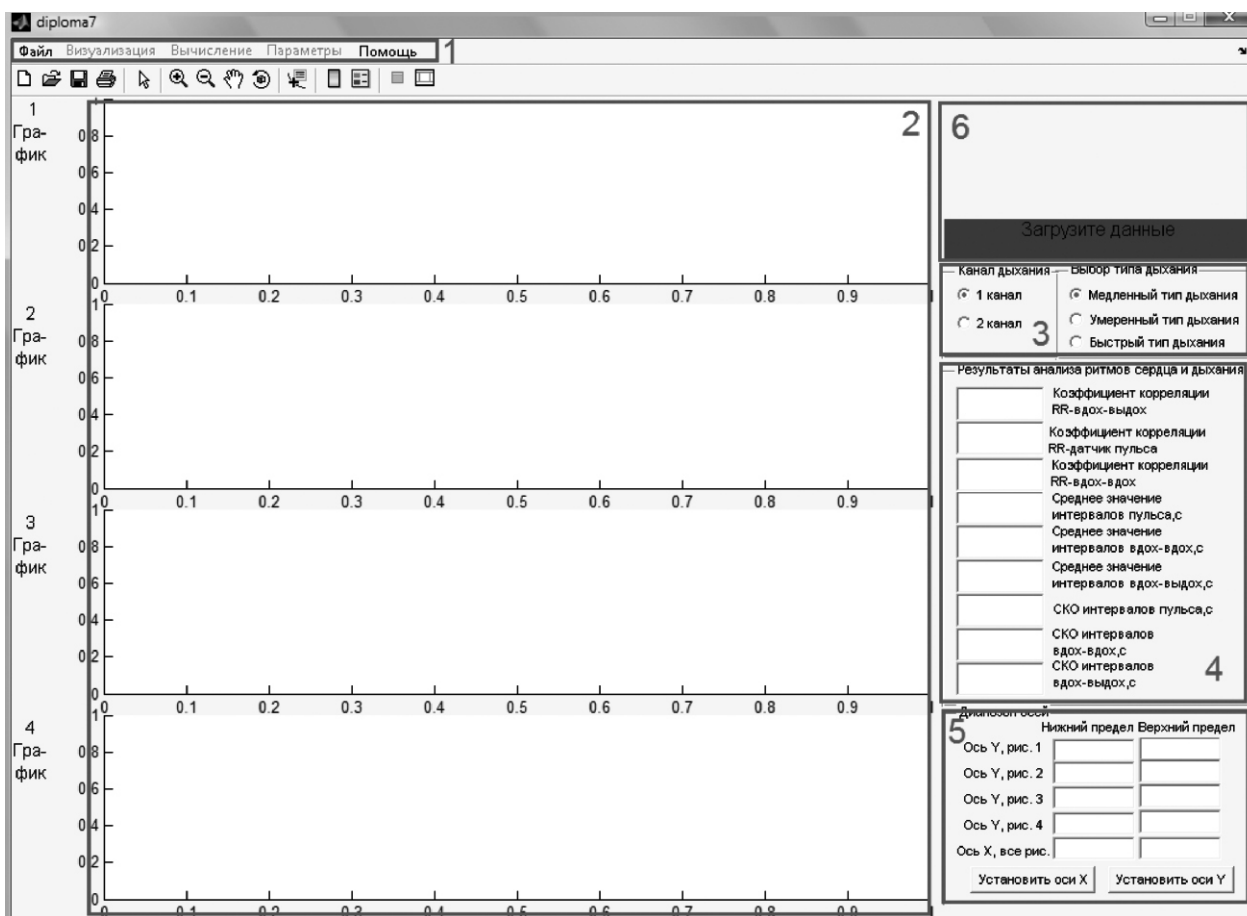


Рис. 2. Внешний вид окна при запуске программы.

Кросскорреляционный анализ ритма сердца и дыхания

При работе с программой открывается файл с данными, интерфейс которой приведен на рис. 2. Из выбранного файла данные загружаются в память компьютера, а также отображаются на графиках в окне программы (рис. 3).

На верхнем графике отображается график дыхания, а на нижнем — пульса. После ввода данных в программу и выбора типа дыхания, пользователь запускает вычисление статистических параметров (Вычисление — Запуск вычисления). Затем открывает доступ к различным режимам отображения графиков (Визуализация).

В проведенных нами исследованиях установлено достоверное снижение кросскорреляционных связей между частотой сердечных сокращений (ЧСС) и частотой дыхания (ЧД), что является характерным признаком и следствием дезинтеграции деятельности различных функциональных систем, возникающей при эмоциональном напряжении [8].

Регистрации и анализ фаз ночного сна

На основе динамической регистрации ЭЭГ и ЭОГ производится кросскорреляционный анализ этих показателей, и выявляются основные фазы сна: фаза «быстрого сна», фаза «медленного сна» и «индифферентного» сна. Регистрация ЭЭГ и ЭОГ, кросскорреляционный анализ этих показателей, запоминание и визуализация фаз сна осуществляется на отдельном автономном портативном модуле, информация с которого может передаваться на ПК для дальнейшего анализа и сохранения.

В программе использован кросскорреляционный критерий, который позволяет различать синфазные, противофазные и некоррелирующие сигналы ЭЭГ и ЭОГ. Текущая фаза сна непрерывно определяется на интервале времени в 20 секунд — эпохе анализа.

На рис. 4 и 5 представлены примеры записи и анализа фаз ночного сна.

Разрабатываемый информационно-аппаратный комплекс впервые позволил проводить комплексное исследование и контроль физиологических функций человека во время естественного сна в повседневных бытовых условиях.

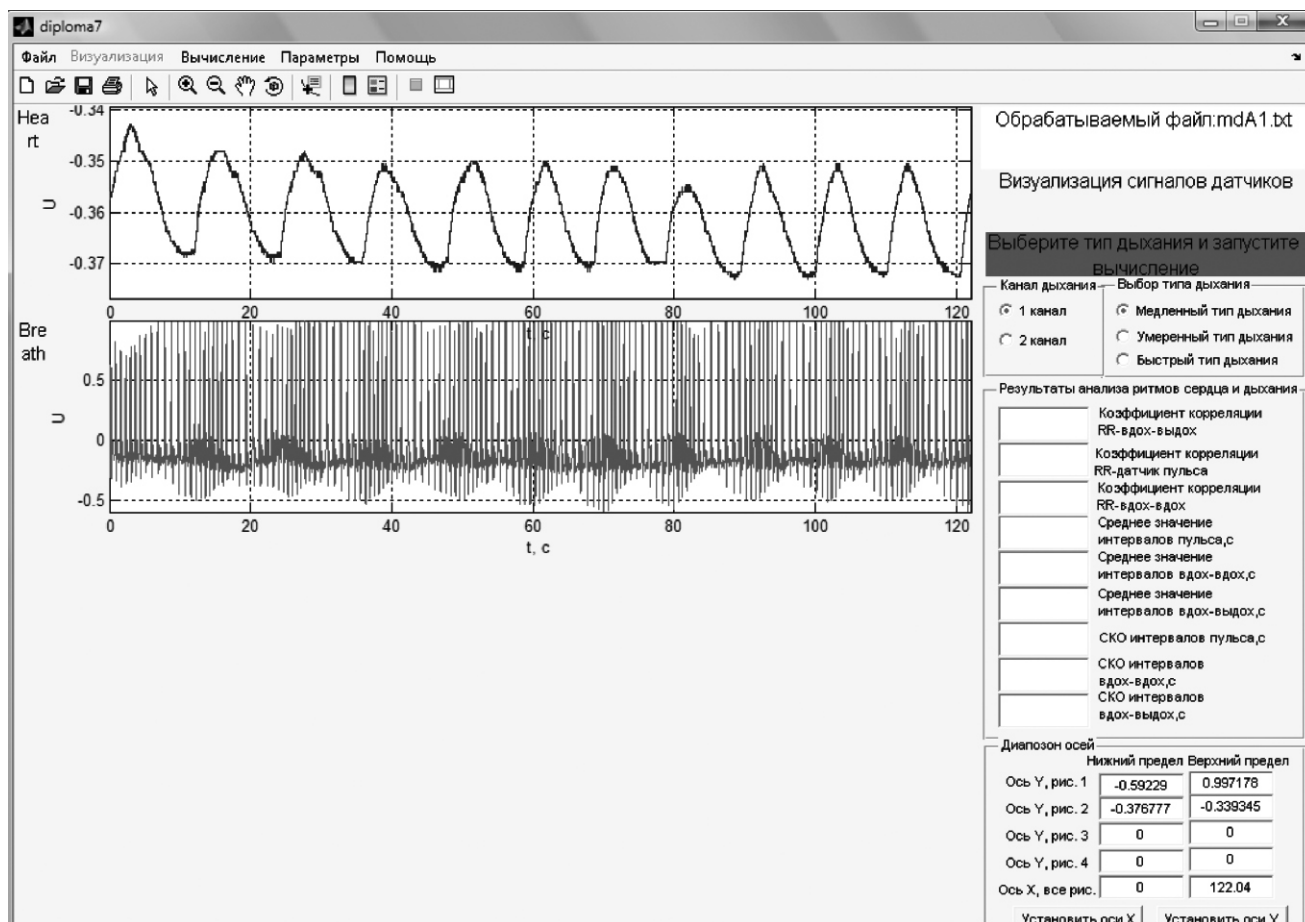


Рис. 3. Вид окна после открытия файла с данными.

*Корреляционные взаимоотношения, варибельность
сердечного ритма и частоты дыхания
во время сна у здоровых людей
и пациентов с различной патологией*

Сон является неоднородным и сложно организованным процессом, ему присущи цикличность, значительные групповые и индивидуальные вариации. Фазы сна характеризуются различными физиологическими проявлениями и отличаются: варибельностью сердечного ритма, величиной артериального давления, частотой дыхания и сердечных сокращений, ЭЭГ, ЭОГ и ЭМГ, изменением температуры тела, гормональными реакциями.

Как правило, во время сна преобладают парасимпатические влияния на сердце. С этим связано существенное понижение во сне ЧСС и системного АД, увеличение стандартного отклонения интервала RR (SDNN) и возникновение респираторной синусовой аритмии.

Симпатическая нервная активность имеет максимальные значения во время бодрствования. Во сне она прогрессивно уменьшается от стадии к стадии и увеличивается во время REM фазы сна, превышая уровень бодрствования во время REM сна. В отличие от REM фазы сна, для NREM фазы сна характерно преобладание парасимпатических влияний [9—11].

Было установлено, что варибельность сердечного ритма (BCP) во время разных стадий сна является объективным тестом оценки функционального состояния сердечно-сосудистой системы [5]. Эти авторы провели обследование больных, у которых была диагностирована хроническая сердечная недостаточность (ХСН). У больных с ишемической болезнью сердца (ИБС) по сравнению с остальными пациентами наблюдалось достоверное снижение как BCP, так и ударного объема сердца в период REM фазы сна. На

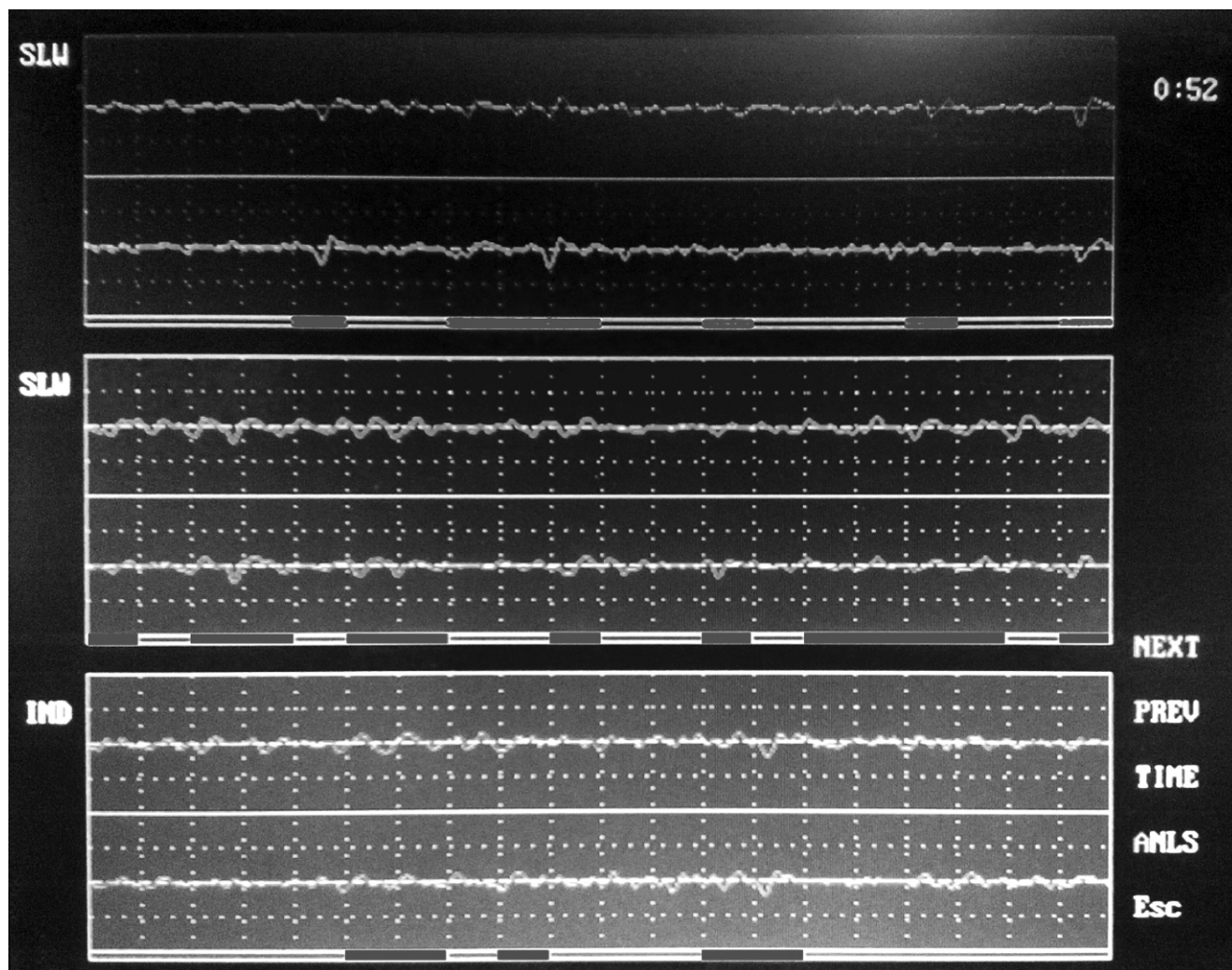


Рис. 4. Текущая регистрация фаз сна. SLW — периоды медленного сна.

основании исследования был сделан вывод, что появление опасных аритмий чаще может происходить во время этой фазы сна.

В другой работе [4] было обнаружено наличие достоверных корреляционных связей между изменениями ЧСС и ЧД во время сна с коэффициентом корреляции (r) равным $0,982 \pm 0,01$.

Большая часть публикаций посвящена сравнительному изучению корреляции изменений ЧД и ВСР во время сна у здоровых испытуемых и больных, страдающих различными заболеваниями. Был проведен сравнительный анализ изменения показателей ВСР, АД и ЧД у здоровых бодрствующих и спящих испытуемых, а также больных с обструктивным синдромом апноэ (ОСА) [12]. На основании проведенных исследований авторы создали многофакторную математическую модель, иллюстрирующую взаимосвязь этих показателей.

В развитии этого направления представлен обзор существующих в настоящее время математических и компьютерных моделей, описывающих кардиореспираторные взаимосвязи и их изменения при переходе от бодрствования ко сну [13].

Проблеме корреляционных взаимоотношений между сердечным и респираторным ритмом в норме и при ОСА посвящена ещё одна работа [6]. Показано, что

у больных с ОСА имеет место достоверное снижение корреляции между показателями сердечного и респираторного ритма по сравнению со здоровыми испытуемыми. Установлено, что кардиореспираторные корреляции связаны с фазами сна, а также обнаружено их достоверное снижение во время быстрых движений глаз по сравнению с медленноволновым сном.

При изучении связи ВСР и ЧД у больных с ОСА показано наличие достоверных корреляционных связей между этими показателями, и приведены их количественные значения, используемые для контроля качества сна [7].

Выявлены нарушения дыхания во сне у больных с сердечной недостаточностью [14] и обнаружено, что у больных, страдающих хроническими головными болями, имеет место увеличение тонуса симпатической нервной системы и снижение тонуса парасимпатической нервной системы по сравнению со здоровыми испытуемыми [15].

Целый ряд исследований посвящен изучению взаимосвязи между сердечно-сосудистыми и дыхательными показателями у детей при переходе от бодрствования ко сну. Эти исследования особенно важны для решения проблемы внезапной остановки дыхания во время сна у новорожденных детей. В одной из работ рассматривается проблема взаимосвязи между

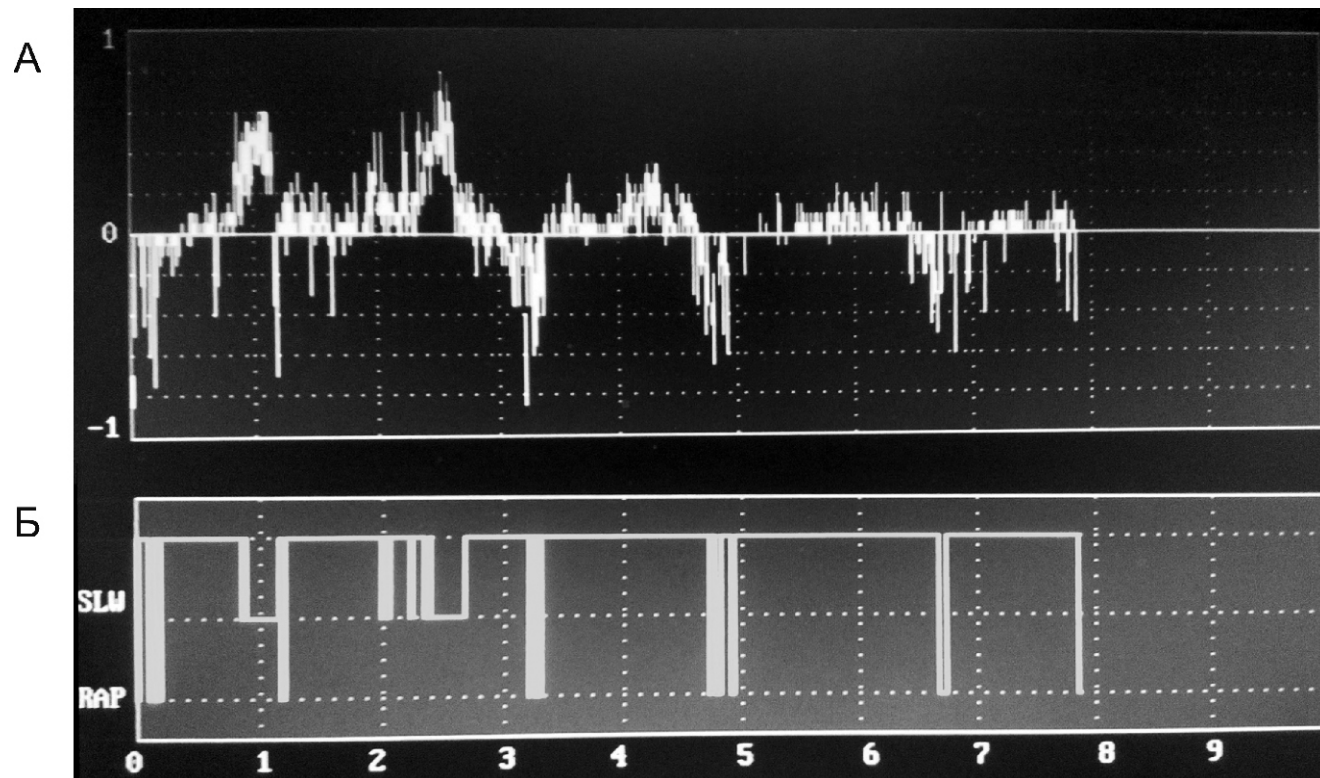


Рис. 5. Запись фаз восьмичасового ночного сна. Динамика величины коэффициента кросскорреляции (А); диаграмма различных фаз ночного сна: RAP — период «быстрого» сна, SLW — периоды «медленного» сна, сверху — периоды «индифферентного» сна (Б).

функциональными системами организма в онтогенетическом аспекте, в том числе закономерности кардиореспираторного взаимодействия на различных стадиях постнатального онтогенеза [16]. Авторы изучали взаимосвязь между частотными характеристиками сердечного и дыхательного ритма в различные фазы сна у младенцев от рождения до 6 месяцев жизни. Показано наличие достоверных изменений этих взаимоотношений: взаимосвязь двухсторонняя в первые дни после рождения и становится однонаправленной (от дыхательного ритма к ритму сердца) в возрасте 6 месяцев.

Заключение

Анализ многочисленных работ указывает на необходимость комплексного исследования сердечно-сосудистых и респираторных функций человека в различные фазы сна в естественных домашних условиях для прерывания опасных для жизни фаз сна, предотвращения выраженных сердечно-сосудистых нарушений, приводящих к мозговому инсульту, инфаркту миокарда и внезапной смерти.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 13-07-00756 «Разработка методологии и информационно-аппаратурного комплекса для объективного контроля сна человека в повседневных условиях»).

Список литературы

1. Вейн А.М. *Нарушения сна и бодрствования*. М.: Медицина; 1974.
2. Вейн А.М., Гехт К. *Сон человека. Физиология и патология*. М.: Медицина; 1989.
3. Левин Я.И. *Инсомния и принципы её лечения. Современная психиатрия имени П.Б. Ганнушкина*. 1998; 3: 6-10.
4. Jovanovic U.J. An experimental contribution to our knowledge of the phenomenology of sleep. In: *Normal Sleep in Man*. Stuttgart: Hippokrates Verlag; 1971: 254-315.
5. Varonesckas G., Zemaityte D. Autonomic heart rate control and JT interval during night sleep stages in coronary disease patients with congestive heart failure. *European Heart Journal*. 1999; 20(Suppl.): 201.
6. Kabir M.M., Dimitri H., Sanders P., Antic R., Naliviko E., Abbott D., Baumert M. Cardiorespiratory phase-coupling is reduced in patients with obstructive sleep apnea. *PLoS One*. 2010; 5(5): e10602.
7. Harrington J., Schramm P.J., Davies C.R., Lee-Chiong T.L. An electrocardiogram-based analysis evaluating sleep quality in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep and Breathing*. 2013; 17(3): 1071-8.
8. Юматов Е.А., Перцов С.С., Дудник Е.Н., Мезенцева Л.В. Концепция информационной аппаратуры для

системного контроля сна в повседневных условиях. *Клиническая информатика и телемедицина*. 2014; 10(11): 54-60.

9. Hornyak M., Cejnar M., Elam M. *et al.* Sympathetic muscle nerve during sleep activity in men. *Brain*. 1991; 114: 1281-95.

10. Shimuzu T., Takahashi Y., Suzuki K. *et al.* Muscle nerve sympathetic activity during sleep and its change with arousal response. *Journal of Sleep Research*. 1992; 1: 178-85.

11. Sommers V.K., Dyken M.E., Mark A.L., Abboud F.M. Sympathetic-nerve activity during sleep in normal subjects. *The New England Journal of Medicine*. 1993; 328(5): 303-7.

12. Khoo M.C., Blasi A. Sleep-related changes in autonomic control in obstructive sleep apnea: A model-based perspective. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 2013; 188(3): 267-76.

13. Ben-Tal A. Computational models for the study of heart-lung interactions in mammals. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. 2012; 4(2): 163-70.

14. Kazmierczak A., Krzesinski P., Krzyzanowski K., Gielera G. Sleep-disordered breathing in patients with heart failure: new trends in therapy. *Bio Med Research International*. 2013; 2013:459613.

15. Gass J.J., Glaros A.G. Autonomic dysregulation in headache patients. *Applied Psychophysiology and Biofeedback*. 2013; 38(4): 257-63.

16. Mrowka R., Cimponeriu L., Patzak A., Rosenblum M.G. Directionality of coupling of physiological subsystems: age-related changes of cardiorespiratory interaction during different sleep stages in babies. *The American Journal of Physiology — Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2003; 285(6): R1395-1401.

Поступила 30.06.15

References

1. Vein A.M. *Disorders of sleep and wakefulness*. Moscow: Meditsina; 1974. (in Russian)
2. Vein A.M., Hecht K. *Human sleep. Physiology and pathology*. Moscow: Meditsina; 1989. (in Russian)
3. Levin Ya.I. *Insomnia and principles of its therapy. Sovremennaya Psikhiatrya imeni P.B. Gannushkina*. 1998; 3: 6-10. (in Russian)
4. Jovanovic U.J. An experimental contribution to our knowledge of the phenomenology of sleep. In: *Normal Sleep in Man*. Stuttgart: Hippokrates Verlag; 1971: 254-315.
5. Varonesckas G., Zemaityte D. Autonomic heart rate control and JT interval during night sleep stages in coronary disease patients with congestive heart failure. *European Heart Journal*. 1999; 20(Suppl.): 201.
6. Kabir M.M., Dimitri H., Sanders P., Antic R., Naliviko E., Abbott D., Baumert M. Cardiorespiratory phase-coupling is reduced in patients with obstructive sleep apnea. *PLoS One*. 2010; 5(5): e10602.
7. Harrington J., Schramm P.J., Davies C.R., Lee-Chiong T.L. An electrocardiogram-based analysis evaluating sleep quality in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep and Breathing*. 2013; 17(3): 1071-8.
8. Yumatov E.A., Pertsov S.S., Dudnik E.N., Mezentseva L.V. Concept of the information equipment for system monitoring of sleep under day-to-day conditions. *Klinicheskaya Informatika i Telemeditsina*. 2014; 10(11): 54-60. (in Russian)

9. Hornyak M., Cejnar M., Elam M. *et al.* Sympathetic muscle nerve during sleep activity in men. *Brain*. 1991; 114: 1281-95.

10. Shimuzu T., Takahashi Y., Suzuki K. *et al.* Muscle nerve sympathetic activity during sleep and its change with arousal response. *Journal of Sleep Research*. 1992; 1: 178-85.

11. Sommers V.K., Dyken M.E., Mark A.L., Abbo-ud F.M. Sympathetic-nerve activity during sleep in normal subjects. *The New England Journal of Medicine*. 1993; 328(5): 303-7.

12. Khoo M.C., Blasi A. Sleep-related changes in autonomic control in obstructive sleep apnea: A model-based perspective. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 2013; 188(3): 267-76.

13. Ben-Tal A. Computational models for the study of heart-lung interactions in mammals. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. 2012; 4(2): 163-70.

14. Kazimierczak A., Krzesinski P., Krzyzanowski K., Gielerak G. Sleep-disordered breathing in patients with heart

failure: new trends in therapy. *Bio Med Research International*. 2013; 2013:459613.

15. Gass J.J., Glaros A.G. Autonomic dysregulation in headache patients. *Applied Psychophysiology and Biofeedback*. 2013; 38(4): 257-63.

16. Mrowka R., Cimponeriu L., Patzak A., Rosenblum M.G. Directionality of coupling of physiological subsystems: age-related changes of cardiorespiratory interaction during different sleep stages in babies. *The American Journal of Physiology — Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2003; 285(6): R1395-1401.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, grant No. 13-07-00756 («Development of the Methodology and Information-and-Equipment Device for an Objective Control of Human Sleep under Living Conditions»).

Received 30.06.15

Сведения об авторах:

Перцов Сергей Сергеевич, доктор мед. наук, акад. РАЕН, заместитель директора по научной работе ФГБНУ «ННИИФ им. П.К. Анохина», зав. каф. нормальной физиологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова

Дудник Елена Николаевна, канд. мед. наук, доцент каф. нормальной физиологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

Крамм Михаил Николаевич, канд. техн. наук, доцент кафедры основ радиотехники Национального исследовательского университета «МЭИ»

Стрелков Николай Олегович, канд. техн. наук, ассистент каф. основ радиотехники Национального исследовательского университета «МЭИ»

Аниховская И.А.^{1,2}, Кубатиев А.А.¹, Салахов И.М.¹, Теблов К.И.³, Яковлев М.Ю.^{1,2,4}

Динамика концентрации эндотоксина в сыворотке крови у больных с острым неосложнённым Q-инфарктом миокарда

¹ — ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² — Институт общей и клинической патологии РАЕН ООО «Клинико-диагностическое общество», Москва, ул. Нижняя Масловка, д. 19

³ — Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва, ул. Делегатская, д. 20

⁴ — Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, ул. Островитянова, д. 1

*Эффективность лечения острого инфаркта миокарда (ОИМ) не соответствует большим материальным затратам по созданию новых лекарственных препаратов, что даёт основания предполагать существование ныне неизвестных механизмов возникновения и развития этого заболевания. Высокая вероятность участия эндотоксинового фактора в патогенезе ОИМ была теоретически обоснована нами уже более четверти века назад, однако клинического подтверждения эта гипотеза до настоящего времени не нашла. В результате проведённого исследования обнаружено значительное увеличение концентрации эндотоксина (ЭТ) в сыворотке крови больных ОИМ, нарастающее от 1 к 14 суткам заболевания. У женщин концентрация ЭТ при ОИМ выше, чем у мужчин, что можно расценивать как фактор, возможно, влияющий на известные различия в течении ОИМ у мужчин и женщин. Источником системной эндотоксинемии (СЭЕ) являлись *Bacteroides*, чаще всего: *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia coli*. В развитии эндотоксиновой агрессии (ЭА) принимали участие в большинстве случаев один или два вида бактерий. У 9,1% больных этиологию СЭЕ верифицировать не удалось, что свидетельствует о наличии источников развития ЭА, не учтенных в данном исследовании. У 25% больных ОИМ выявлены серологические признаки системного кандидоза, который способен усилить биологическое действие ЭТ.*

Ключевые слова: острый инфаркт миокарда; эндотоксин; эндотоксиновая агрессия; этиология; патогенез

Anikhovskaya I.A.^{1,2}, Kubatiev A.A.¹, Salakhov I.M.¹, Tebloev K.I.³, Yakovlev M.Yu.^{1,2,4}

Changes of endotoxin concentration in blood serum in patients with uncomplicated acute myocardial Q-infarction

¹ — Institute of General Pathology and Pathophysiology, 125315, Moscow, Baltiyskya str., 8

² — Institute of General and Clinical Patology of Clinical Diagnostic Society, Russian Academy of Natural Sciences., 19, N.Maslovka

³ — Moscow State Medical Stomatological University n.a. A. I. Evdokimov. 20/1 Delegatskaya, Moscow, Russia

⁴ — Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU). Ostrovitianov str. 1, Moscow, Russia, 117997

*The effectiveness of acute myocardial infarction (AMI) treatment does not correspond to high material costs for the study of its pathogenesis and development of new drugs. This circumstance gives the grounds to assume existence of nowadays unknown mechanisms of emergence and development of this disease. High probability of participation of endotoxin (ET) in the pathogenesis of AMI was theoretically proved by us for more than a quarter of the century ago, but it's clinical evidence to date is not found yet. As a result of the study a significant increase of endotoxin (ET) concentration in the blood serum of patients with AMI increasing from 1 to 14 day of the disease has been found. In women the concentration of ET was higher than in men. It allows to qualify the EA as a factor probably influencing the known difference in AMI tolerance in men and women. The source of ET were *Bacteroides* (most often — 67,8% of patients), *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia coli*. One or two bacteria more often took part in the development of EA. In 9.1% of patients the etiology of EA could not be verified, what indicates the presence of other sources of EA, not evaluated in this study. In 25% of patients with AMI serologic evidence of systemic candidiasis, caused by *Candida Albicans*, has been found, what is able to enhance the biological effects of ET.*

Key words: acute myocardial infarction; endotoxin; endotoxin aggression; etiology; pathogenesis

Для корреспонденции: Яковлев Михаил Юрьевич, доктор мед. наук, проф., зав. лаб. системной эндотоксинемии и шока ФГБНУ «НИИ Общей патологии и патофизиологии», проф. каф. патологической анатомии РНИМУ им. Н.И. Пирогова, директор Института общей и клинической патологии РАЕН ООО «Клинико-диагностическое общество», e-mail: yakovlev-lps@yandex.ru

Острый инфаркт миокарда (ОИМ) занимает одно из ведущих мест среди причин смертности населения России и других экономически развитых стран. В основе развития ОИМ, как правило, лежит атеросклероз, среди факторов риска которого выделяют стрессорный, почечный (гипертензивный), диабетический, алиментарный (ожирение) и тромбогенный компоненты. Перечисленные факторы риска имеют одну общую черту. Все они являются причиной повышения концентрации кишечного эндотоксина (ЭТ) в системном кровотоке, т.е. эндотоксиновой агрессии (ЭА) и, в то же время, ее следствием. Стресс увеличивает объём сброса portalной крови в общий кровоток [1], почечная недостаточность затрудняет выведение ЭТ из гемодинамики [2], липидный компонент пищевого рациона обеспечивает механизм транспорта ЭТ в кровь в составе хиломикрон [3], а

ЭА, в свою очередь, индуцирует развитие ДВС-синдрома [4, 5] и сахарного диабета первого типа [6]. Эти факторы риска были рассмотрены в нашем предыдущем исследовании, в результате которого была сформулирована эндотоксиновая теория атеросклероза [7]. Что же касается возможного участия ЭТ в патогенезе ОИМ, то сведения об этом присутствуют лишь в экспериментальных работах на животных (рис. 1), опубликованных более 30 лет назад [8, 9].

Источником ЭТ, представляющего собой липополисахарид (ЛПС), в организме человека является грамотрицательная микрофлора (главным образом толстой кишки [10]). Молекула ЛПС состоит из трёх частей (рис. 2): липида А (или Ре-гликолипид — ГЛП), погружённого в липидный бислой клеточной мембраны, который является носителем общих для всех ЛПС биологических свойств (способность

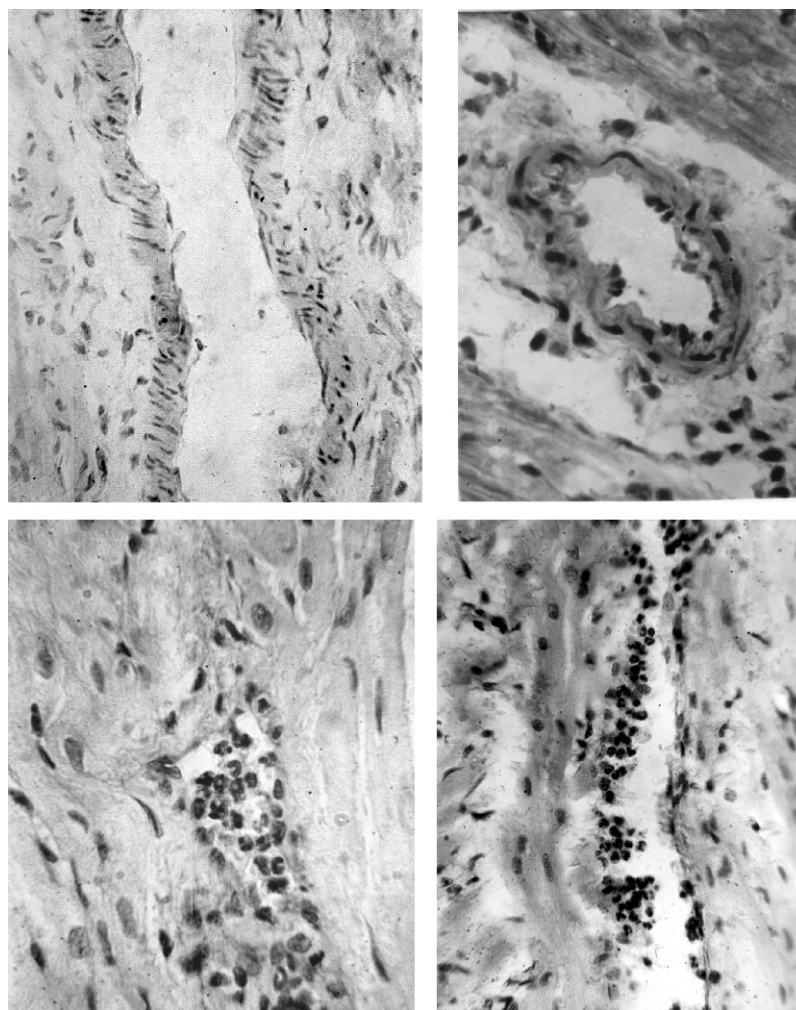


Рис. 1. Артериолы (вверху) и вены (внизу) миокарда кролика при экспериментальном эндотоксиновом шоке. Окраска гематоксилином и эозином. Альтеративные (в первые сутки) изменения эндотелиальной выстилки артериолы (слева) уже через 3–5 суток сменяются пролиферацией эндотелиальных мезангиальных клеток. Маргинальный лейкоцитоз (слева) может сопровождаться нарушением целостности стенки венулы (справа) уже в первые сутки исследования [9].

активировать иммунитет, миелопоэз, гемостаз, эндокринные органы, ЦНС, перекисное окисление липидов, индуцировать развитие синдромов ДВС и полиорганной недостаточности) [10]. Структура ГЛП консервативна и практически идентична у всех грамотрицательных микроорганизмов, тогда как две других части молекулы ЭТ (полисахарид и ядро) по составу и количеству сахаров вариабельны, что обеспечивает возможность верификации той или иной грамотрицательной бактерии при помощи серологических методов исследования [11].

ЭА индуцирует развитие различных заболеваний и квалифицируется эндотоксिनотворной теорией физиологии и патологии человека как предболезнь или универсальный фактор патогенеза [9], что находит своё подтверждение в клинической практике [1—6, 12—15]. В целом ряде научных публикаций показана способность ЭА индуцировать развитие локального и системного воспаления, эндотелиальной дисфункции и ДВС-синдрома, обуславливать спазм коронарных артерий и снижение сократительной способности миокарда, быть важным атерогенным фактором [2, 4, 7—10], что может иметь прямое отношение к возникновению и прогрессированию ОИМ. Однако с клинических позиций эта проблема практически не разработана, что и побудило нас к настоящему исследованию.

Цель работы — определение интегральных показателей системной эндотоксинемии (СЭЕ) и её этиологии.

Методика

В исследование включены 56 больных с Q-образующим ОИМ (основная группа) и 45 здоровых лиц (контрольная группа).

Все пациенты с ОИМ поступили в блок интенсивной терапии ГКБ № 19 г.Москвы. Среди них было 40 мужчин и 16 женщин в возрасте от 39 до 84 лет (средний возраст $63 \pm 6,3$ года). У 28 больных (50%) диагностирован передний инфаркт миокарда, у 28 (50%) — задний. Диагноз ОИМ устанавливался на основании наличия интенсивного ангинозного приступа, электрокардиографических признаков острого Q-образующего ИМ (подъем сегмента ST, патологический зубец Q), лабораторных критериев (повышение концентрации в крови КФК-МВ, сердечных тропонинов). У 13 пациентов (у 23% больных) ОИМ был повторным. Среди сопутствующих заболеваний у 37 больных (66%) имела артериальная гипертензия.

Все пациенты получали стандартную терапию ОИМ (с учётом противопоказаний): нитраты, β -блокаторы, иАПФ, антиагреганты, антикоагулянты, статины. 31 больному (55%), поступившему в срок ме-

нее 12 ч от развития ангинозного приступа, проводился тромболитизис.

В данное исследование были включены пациенты, у которых ОИМ протекал без осложнений. Все больные успешно прошли курс лечения и выписались в установленные сроки. В исследование не включались пациенты, имевшие признаки острых инфекционных заболеваний в момент включения в исследование и хронических инфекционных заболеваний в анамнезе, сахарного диабета 1—2 типов, ожирения 1—3 степени.

Результаты обследования основной группы сравнивались с соответствующими показателями сопоставимой по возрасту контрольной группы. Ее составили 23 мужчины и 22 женщины в возрасте 35—79 лет (средний возраст — $64 \pm 6,9$ года). У пациентов контрольной группы не было признаков острых и хронических инфекционных заболеваний, сахарного диабета и ожирения.

Определение концентрации ЛПС в сыворотке крови осуществлялось при помощи ЛАЛ-теста с использованием реактива E-toxate («Sigma») в авторской модификации (в ЕУ/мл). Определение источников развития СЭЕ осуществлялось серологическим методом, основанном на определении антител (АТ) к бактероидам, клебсиелле, синегнойной и кишечной палочке, протее (в у.е.о.п). Серологические признаки дисбиоза, ассоциированного с Candida, изучались методом иммуноферментного анализа на полистироловых планшетах (производства ЗАО «КДО»). Этиология ЭА считалась выявленной, если показатели АТ троекратно превышали верхнюю границу нормы или были троекратно меньше нижней границы нормативных показателей.

Статистическая обработка результатов осуществлялась в программе «Microsoft Excel» с дополнительным программным пакетом для статистического анализа. Производилось вычисление среднего значения,

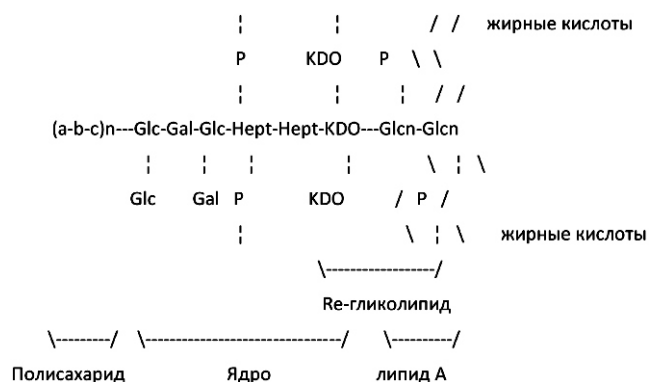


Рис. 2. Строение молекулы липополисахарида по E.Rietschel & O.Westphal [11] в авторской модификации. Гидрофильные фрагменты молекулы (полисахарид и ядро) вариабельны. Гидробобный фрагмент ЛПС консервативен.

вычисление стандартного отклонения, расчет достоверности и критерия Стьюдента, построение диаграмм. Различия между группами считались достоверно значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Большой интерес представляет определение концентрации ЭТ в крови здоровых пациентов контрольной группы, так как этот вопрос недостаточно освещен в литературе (табл. 1).

Средняя величина концентрации ЭТ в крови у пациентов контрольной группы составила $0,70 \pm 0,03$ EU/ml. У мужчин этот показатель был равен $0,67 \pm 0,05$ EU/ml, у женщин — $0,73 \pm 0,06$ EU/ml.

Уровень СЭЕ у больных ОИМ изучался на 1-е, 7-е и 14-е сут. заболевания (табл. 2—4).

Уже в 1 сут. ОИМ имеет место достоверное (более чем в 2 раза) повышение концентрации ЭТ в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой.

К 7-м суткам ОИМ уровень этого показателя продолжал увеличиваться и почти в 3 раза превышал концентрацию ЭТ в крови пациентов контрольной группы. У женщин этот показатель был больше, чем у мужчин, однако на данном этапе заболевания это различие было статистически недостоверно.

К 14-м сут. развития ОИМ нарастание уровня СЭЕ у обследованных больных продолжалось. Концентрация ЭТ в сыворотке крови на этом этапе заболевания была достоверно повышена в сравнении не только

Концентрация эндотоксина в сыворотке крови пациентов контрольной группы

Таблица 1

	Общее количество пациентов	Концентрация ЛПС, EU/ml
1	Мужчины, n = 23	$0,67 \pm 0,05$
2	Женщины, n = 22	$0,73 \pm 0,06$
3	Всего, n = 45	$0,70 \pm 0,03$

Концентрация эндотоксина в исследуемой группе в 1 сутки ОИМ

Таблица 2

Количество больных	Концентрация эндотоксина, EU/ml		Достоверность
	1 сут.	Контроль	
Мужчины, n = 40	$1,7 \pm 0,19$	$0,67 \pm 0,05$	*
Женщины, n = 16	$1,48 \pm 0,17$	$0,73 \pm 0,06$	*
Всего, n = 56	$1,64 \pm 0,21$	$0,70 \pm 0,03$	*

Примечание. * — $P < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Концентрация эндотоксина в исследуемой группе на 7-е сут. ОИМ

Таблица 3

Количество больных	Концентрация эндотоксина, EU/ml		Достоверность
	7 сут.	Контроль	
Мужчины, n = 40	$1,9 \pm 0,19$	$0,67 \pm 0,05$	*
Женщины, n = 16	$2,31 \pm 0,36$	$0,73 \pm 0,06$	*
Всего, n = 56	$2,02 \pm 0,17$	$0,70 \pm 0,03$	*

Примечание. * — $P < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Концентрация эндотоксина в исследуемой группе на 14 сут. ОИМ

Таблица 4

Количество больных	Концентрация эндотоксина, EU/ml		Достоверность
	14 сут.	Контроль	
Мужчины, n = 40	$2,03 \pm 0,18$	$0,67 \pm 0,05$	*
Женщины, n = 16	$2,44 \pm 0,42$	$0,73 \pm 0,06$	**
Всего, n = 56	$2,16 \pm 0,18$	$0,70 \pm 0,03$	**

Примечание. * — $P < 0,05$ по сравнению с контрольной группой; ** — $P < 0,05$ по сравнению с первыми сутками ОИМ

с контрольной группой, но и с 1 сут. заболевания. При этом достигалась эта достоверность за счет большей концентрации ЭТ в крови больных ОИМ женского пола.

На рис. 3 в суммарном виде представлена динамика уровня ЭТ на 1—7—14 сутки ОИМ.

Обнаруженная нами нарастающая СЭЕ у больных ОИМ, которая квалифицируется эндотоксиновой теорией как универсальный механизм патогенеза ряда заболеваний, позволяет рассматривать как вполне вероятный механизм индукции ОИМ воспаление, являющееся доказанным следствием СЭЕ. Это предположение согласуется и с недавно сформулированной эндотоксиновой теорией атеросклероза [7], который является базисным элементом ОИМ. При этом методы воздействия на концентрацию ЛПС в современных схемах лечения ОИМ отсутствуют.

Кроме того, обращает на себя особое внимание следующее обстоятельство. И в контрольной группе, и в группе больных с ОИМ на разных его сроках содержание ЭТ в крови у женщин несколько выше, чем у мужчин, хотя статистическая достоверность этих различий появляется лишь к 14 сут. ОИМ. Известно, что женщины по сравнению с мужчинами заболевают ОИМ в более позднем возрасте, однако тяжелее переносят его осложнения, в связи с чем женская смертность от ОИМ больше, чем мужская. По нашему мнению, объяснение этому феномену в дальнейших исследованиях на большем количестве материала следует искать, в том числе, и в различии уровня СЭЕ при ОИМ у мужчин и женщин.

Определение источников развития ЭА дало следующие результаты. Трёхкратное повышение (или снижение) концентрации АТ к грамотрицательным бактериям кишечной микрофлоры обнаружено у 51 из 56 обследованных больных ОИМ (табл. 5).

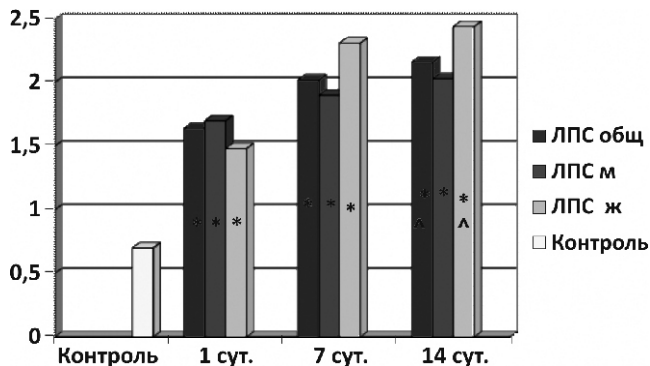


Рис. 3. Динамика нарастания концентрации ЛПС у пациентов с ОИМ в остром периоде:

* — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой; Δ — $p < 0,05$ по сравнению с 1 сут. заболевания.

Согласно полученным нами данным, вклад различных видов грамотрицательных бактерий в развитие ЭА у больных ОИМ неодинаков. Чаще всего в формировании СЭЕ участвуют бактероиды (у 67,8% больных).

У 5 больных не удалось выявить этиологию ЭА. Это свидетельствует о том, что источником СЭЕ при ОИМ могут быть и другие представители грамотрицательной кишечной микрофлоры, не учтенные в проведенном исследовании.

Чаще в развитии ЭА согласно полученным данным участвуют один или два вида грамотрицательных бактерий (у 57,1% и 21,4% пациентов соответственно), значительно реже — 3—5 видов (табл.6).

У 14 больных (25% всех пациентов с ОИМ) выявлено трёхкратное увеличение или снижение АТ к кандидам, что свидетельствует о наличии у них серологических признаков дисбиоза, ассоциированного с candida Albicans. Это также является очень важным

Таблица 5
Частота участия грамотрицательных бактерий в формировании эндотоксиновой агрессии у больных с ОИМ

n/n	Вид микроорганизма	Кол-во больных (%)
1	Bacteroides	38 (67,8)
2	Klebsiella	16 (28,5)
3	Pseudomonas	16 (28,5)
4	Proteus	12 (21,4)
5	Escherichia coli	11 (19,6)

Таблица 6
Сочетания источников СЭЕ (от 1 до 5) у больных с ОИМ

Количество источников СЭЕ у одного больного	1	2	3	4	5	0
Кол-во больных	32	12	4	2	1	5
%	57,1	21,4	7,1	3,6	1,7	9,1

фактом, поскольку кандиды способны потенцировать биологические эффекты ЛПС [10].

Выводы

1. У больных ОИМ обнаружено значительное повышение концентрации ЭТ кишечной грамотрицательной микрофлоры в сыворотке крови, нарастающее от 1 к 14 сут. заболевания и более выраженное у женщин.

2. Источником СЭЕ чаще являются *Bacteroides* (67,8%), реже — *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia coli* (28,5% — 19,6%).

3. В развитии ЭА в большинстве случаев принимает участие один (57,1%) или два (21,4%) вида бактерий, значительно реже — 3—5 видов. У 9,1% больных этиологию ЭА использованной методикой выявить не удалось.

4. У 25% пациентов с ОИМ выявлены серологические признаки дисбиоза, ассоциированного с *Candida Albicans*.

Список литературы

1. Anikhovskaya I.A., Oparina O.N., Yakovleva M.M. and Yakovlev M.Yu. Intestinal endotoxin as a universal factor of adaptation and pathogenesis of general adaptation syndrome. *Hum. Physiol.* 2006; 32 (2): 200.
2. Мешков М.В., Аниховская И.А., Гатауллин Ю.К., Яковлев М.Ю. Эндотоксиновая агрессия как универсальный фактор патогенеза расстройств гемостаза у детей с урологической патологией. *Урология.* 2006; 1: 15.
3. Okorokov P.L., Anikhovskaya I.A., Yakovleva M.M. et al. Nutritional factors of inflammation induction or lipid mechanism of endotoxin transport. *Hum. Physiol.* 2012; 38 (6): 649.
4. Meshkov M.V., Anikhovskaya I.A., Yakovleva M.M. and Yakovlev M.Yu. Intestinal endotoxin in regulation of hemostasis activity and in pathogenesis of the DIC syndrome // *Hum. Physiol.* 2005; 31 (6): 700.
5. Мешков М.В., Гатауллин Ю.К., Иванов В.Б., Яковлев М.Ю. *Эндотоксиновая агрессия как причина послеоперационных осложнений в детской хирургии (новые перспективы профилактики)*. Москва: Новые лечебно-диагностические технологии. 2007. Книга 2.
6. Okorokov P.L., Anikhovskaya I.A., Volkov I.E. and Yakovlev M.Yu. Intestinal endotoxin as a trigger of type 1 diabetes mellitus. *Hum. Physiol.* 2011; 37 (2): 247.
7. Anikhovskaya I.A., Kubatiev A.A. and Yakovlev M.Yu. Endotoxin Theory of Atherosclerosis. *Hum. Physiol.* 2015; 41 (1): 89.
8. Яковлев М.Ю. Метаболическая гетерогенность миокарда и феномен централизации кровообращения в сердечной мышце при эндотоксиновом шоке. *Вестник РАМН.* 1981; 5: 26.
9. Яковлев М.Ю. Морфология миокарда при эндотоксиновом шоке. *Арх. патологии.* 1985; 7: С. 34.
10. Яковлев М.Ю. *Кишечный эндотоксин и воспаление*. Дерматовенерология. Национальное руководство. Краткое издание. М., ГЭОТАР-Медиа; 2013. Гл. 8. С. 70.

11. Rietschel E. & Westphal O. *Endotoxin: Historical Perspectives*. In *Endotoxin in Health and Disease* edited by H. Bode, S. Opal, S. Vogel, D. Morrison. New York. Basel. 1999: 1.

12. Вышегуров Я.Х., Аниховская И.А., Батманов Ю.Е., Яковлев М.Ю. Кишечный эндотоксин в патогенезе воспалительной патологии глаза и антиэндотоксиновая составляющая её лечения. *Патол. физиол. и эксперим. тер.* 2007; 1: 12.

13. Enukidze G.G., Anikhovskaya I.A., Marachev A.A., Yakovlev M. Yu. Endotoxin Aggression in the Pathogenesis of Chronic Inflammatory Diseases of the Small Pelvis Organs and Infertility, or an Antiendotoxin Approach to Their Treatment. *Human Physiology.* 2006; 32 (3): 351.

14. Савельев В.С., Петухов В.А., Магомедов М.С. *Лидный дистресс-синдром*. М.: МАКС Пресс; 2007.

15. Мешков М.В., Гатауллин Ю.К., Файзулин А.К., Яковлев М.Ю. Современный взгляд на профилактику послеоперационных осложнений у детей с obstructивными уропатиями. *Андрология и генитальная хирургия.* 2011; 1: 59.

16. Пермяков Н.К., Яковлев М.Ю. Сердце при эндотоксиновом шоке. *Патол. физиол. и эксперим. тер.* 1990; 2: 45.

17. Яковлев М.Ю. Эндотоксиновый шок. *Казанский медицинский журнал.* 1987; 3: 207.

18. Егорова Е.Н., Калинин М.Н., Мазур Е.С. Эндотоксинемия и системное воспаление в патогенезе хронической сердечной недостаточности. *Патол. физиол. и эксперим. тер.* 2011; 4: 42-46.

Поступила 05.05.15

References

1. Anikhovskaya I.A., Oparina O.N., Yakovleva M.M. and Yakovlev M.Yu. Intestinal endotoxin as a universal factor of adaptation and pathogenesis of general adaptation syndrome. *Hum. Physiol.* 2006; 32 (2): 200.
2. Meshkov M.V., Anikhovskaya I.A., Gataullin Yu.K., Yakovlev M.Yu. Endotoxin aggression as a universal factor in the pathogenesis of disorders of hemostasis in children with urological pathology. *Urologiya.* 2006; 1: 15. (in Russian)
3. Okorokov P.L., Anikhovskaya I.A., Yakovleva M.M. et al. Nutritional factors of inflammation induction or lipid mechanism of endotoxin transport. *Hum. Physiol.* 2012; 38 (6): 649.
4. Meshkov M.V., Anikhovskaya I.A., Yakovleva M.M. and Yakovlev M.Yu. Intestinal endotoxin in regulation of hemostasis activity and in pathogenesis of the DIC syndrome. *Hum. Physiol.* 2005; 31 (6): 700.
5. Meshkov M.V., Gataullin Yu.K., Ivanov V.B., Yakovlev M.Yu. *Endotoxin aggression as a cause of postoperative complications in pediatric surgery (new prospects for prevention)*. Moscow: New diagnostic and treatment technologies; 2007. Book 2. 143 p (in Russian).
6. Okorokov P.L., Anikhovskaya I.A., Volkov I.E. and Yakovlev M.Yu. Intestinal endotoxin as a trigger of type 1 diabetes mellitus. *Hum. Physiol.* 2011; 37 (2): 247.
7. Anikhovskaya I.A., Kubatiev A.A. and Yakovlev M.Yu. Endotoxin Theory of Atherosclerosis. *Hum. Physiol.* 2015; 41 (1): 89.
8. Yakovlev M.Yu. Metabolic heterogeneity of the myocardium and the phenomenon of centralization of blood circulation in the heart muscle in endotoxin shock. *Vestnik Ros-*

siiskoy Akademii Meditsinskikh Nauk. 1981; 5: 26. (in Russian)

9. Yakovlev M.Yu. Morphology of myocardium in endotoxin shock. *Arkhiv patologii.* 1985; 7: 34. (in Russian)

10. Yakovlev M.Yu. *Intestinal endotoxin and inflammation.* Dermatology. National guideline. Short publication. Moscow: GEOTAR-Media; 2013. Ch. 8. P. 70. (in Russian)

11. Rietschel E. & Westphal O. *Endotoxin: Historical Perspectives.* In *Endotoxin in Health and Disease* edited by H.Bode, S.Opal, S.Vogel, D.Morrison. New York. Basel. 1999: 1.

12. Vyshegurov Ya.X., Anikhovskaya I.A., Batmanov Yu.E., Yakovlev M. Yu. Intestinal endotoxin in the pathogenesis of inflammatory diseases of the eye and anti-endotoxin component of its treatment. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya.* 2007; 1: 12. (in Russian)

13. Enukidze G.G., Anikhovskaya I.A., Marachev A.A., Yakovlev M. Yu. Endotoxin Aggression in the Pathogenesis of Chronic Inflammatory Diseases of the Smal Pelvis Organs

and Infertility, or an Antiendotoxin Approach to Their Treatment. *Human Physiology.* 2006; 32 (3): 351.

14. Savelyev V.S., Petukhov V.A., Magomedov M.S. *Lipid distress-syndrome.* Moscow. MAX Press. 2007. 438 p. (in Russian)

15. Meshkov M.V., Gataullin Yu.K., Fayzulin A.K., Yakovlev M. Yu. The modern view on the prevention of postoperative complications in children with obstructive uropathy. *Andrologiya I genitalnaya khirurgiya.* 2011; 1: 59. (in Russian)

16. Permyakov N.K., Yakovlev M. Yu. Heart in endotoxin shock. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya.* 1990; 2: 45. (in Russian)

17. Yakovlev M. Yu. Endotoxin shock. *Kazanskiy Med. zhurnal.* 1987; 3: 207. (in Russian).

18. Egorov E.N., Kalinkin M.N., Mazur E.S. Endotoxemia and systemic inflammation in the pathogenesis of chronic heart failure. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya.* 2011; 4: 42-46. (in Russian)

Received 05.05.15

Сведения об авторах:

Аниховская Ирина Альфредовна — канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. системной эндотоксинемии и шока ФГБНУ «НИИ Общей патологии и патофизиологии», гл. врач Института общей и клинической патологии РАЕН ООО «Клинико-диагностическое общество», e-mail: 5129118@gmail.com

Кубатиев Аслан Амирханович — доктор мед. наук, проф., акад. РАН, директор ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», e-mail: aslankubatiev@gmail.com

Салахов Ильшат Мазгарович — канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории системной эндотоксинемии и шока ФГБНУ «НИИ Общей патологии и патофизиологии» РАН, e-mail: 7261314@mail.ru;

Теблов Константин Иналович — доктор мед. наук, проф., зав. каф. госпитальной терапии № 2 Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова, e-mail: tebloev.k@rambler.ru

Левин Г.Я., Сухарева Е.Г.

Влияние эритроцитарных микровезикул на агрегацию тромбоцитов при ожоговой болезни

ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России, 603155, Нижний Новгород, Верхневолжская набережная, 18/1

Ожоговая болезнь сопровождается значительными нарушениями гемостаза, в том числе — первичного, связанного с агрегацией тромбоцитов. Роль эритроцитарных микровезикул в этом процессе остается неизученной. Эритроцитарные микровезикулы выделяли из отмытых и хранящихся в течение суток эритроцитов путем ультрацентрифугирования при 100000g. Подсчитывали их концентрацию с помощью проточного цитофлуориметра и стандартизировали их количество в пробах. Исследовали антитромбиновую активность эритроцитарных микровезикул индуцированную и неиндуцированную гепарином клотинговым методом. Изучали стимулирующую АДФ, а также спонтанную агрегацию тромбоцитов в условиях искусственного сдвигового потока. Показано, что в ранний период ожоговой болезни в крови в 4,2 раза увеличивается количество эритроцитарных микровезикул. Установлено, что микровезикулы, выделенные из эритроцитов ожоговых больных обладают значительно меньшим антиагрегационным действием, чем микровезикулы, выделенные из эритроцитов доноров. Установлено, что важной причиной этого является значительное снижение антитромбиновой активности в эритроцитарных микровезикулах ожоговых больных по сравнению с нормой. Можно заключить, что снижение антиагрегационного действия и антитромбиновой активности эритроцитарных микровезикул, происходящее на фоне увеличения их концентрации в крови, способствует развитию постожоговой тромбофилии.

Ключевые слова: эритроциты; микровезикулы; ожоговая болезнь; агрегация тромбоцитов; антитромбиновая активность

Levin G.Ya., Sukhareva E.G.

The influence of erythrocyte-derived microvesicles on aggregation of platelets in burn injury

Federal State Budgetary Institution «Privolzhsky Federal Research Medical Centre» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 603155, Nizhny Novgorod, Verhne-Volzhskaya nab., 18/1

Burn Injury is accompanied by a significant homeostasis disorder, including the disorder of primary homeostasis, associated with aggregation of platelets. The role of erythrocyte-derived microvesicles in this process has not undergone thorough research. Microvesicles were isolated from washed erythrocytes after one day of storage by ultracentrifugation at 100000 g. The number of MVs was determined by flow cytometry and was standardized in the samples. Heparin-dependent and heparin-independent antithrombin activity in erythrocyte microvesicles was studied by coagulation method. We studied platelet aggregation induced and not induced by ADP under the conditions of artificial shear flow. It was shown that at the early stage of burn injury the number of erythrocyte-derived microvesicles in blood demonstrated a 4.2 -fold increase. We determined that microvesicles, derived from the erythrocytes of burn patients displayed a significantly less aggregation activity than the microvesicles from donors. The main reason is a considerably lower antithrombin activity in the erythrocyte microvesicles of burn patients. Thus, we can conclude that the decrease of antiaggregation and antithrombin activity of erythrocyte microvesicles associated with the increase in their concentration in blood contributes to thrombophilia of burn patients.

Keywords: erythrocytes, microvesicles, burn injury, platelet aggregation, antithrombin activity

Существует большое количество работ, посвященных нарушению гемостаза при ожоговой болезни [1—3]. В них, как правило, сообщается о выраженной гиперкоагуляции, вплоть до развития ДВС-синдрома после термической травмы. Указывается на

множество причин, вызывающих эту гиперкоагуляцию — выброс тканевого тромбопластина, гиперадреналинемию, гемолиз эритроцитов, активацию перекисного окисления липидов, протеолиза и ряд других факторов [3—5]. Известно, что принципиально важную роль в гемокоагуляции играет агрегация тромбоцитов, обуславливающая первичный гемостаз. Ранее нами было показано, что после термической травмы

Для корреспонденции: Левин Григорий Яковлевич, заслуженный деятель науки РФ, доктор мед. наук, проф., руководитель отделения гравитационной хирургии и гемодиализа, e-mail: levin@unn.ac.ru

резко повышается спонтанная (поток-индуцированная) агрегация тромбоцитов [6]. Механизм гиперагрегации тромбоцитов после ожога остается мало изученным. Совершенно неисследованным является вопрос о возможной роли микровезикул (МВ), в частности, эритроцитарных МВ, в развитии гиперагрегационного синдрома после термической травмы. В многочисленных исследованиях, посвященных гемокоагуляционной функции эритроцитарных микровезикул (эМВ), показано, что они обладают высокой прокоагулянтной активностью, связанной, главным образом, с тем, что имеющиеся на их мембранах фосфатидилсериновые (ФС) кластеры представляют каталитическую поверхность для внутренней и внешней теназы и протромбиназного комплекса [7].

Цель исследования — изучение участия эритроцитарных микровезикул в процессе агрегации тромбоцитов при ожоговой болезни.

Методика

Исследовано 30 образцов крови больных в возрасте от 18 до 65 лет в острый период ожоговой болезни (ожог II—III степени, более 20% поверхности тела) и 40 образцов крови здоровых людей. Кровь стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) получали путем центрифугирования цитратной крови в течение 7 мин при 1000 об./мин. Затем кровь центрифугировали 20 мин при 3000 об./мин., после чего отделяли бестромбоцитарную плазму, удаляли лейкоцитарно-тромбоцитарную пленку и выделяли эритроцитарную массу. Последнюю трижды отмывали в физиологическом растворе, а затем ресуспензировали в трис-буфере в соотношении 2:1 и инкубировали при 37°C в течение 24 ч. В процессе хранения отмытых эритроцитов происходит накопление МВ [8]. После инкубации эритроциты осаждали с помощью центрифугирования в течение 20 мин при 3000 об./мин, затем надосадочную жидкость очищали [9] от клеточного дебриса. Оценка количества и стандартизация концентрации эМВ проводилась на проточном цитофлюориметре Navios/Gallios (Beckman Coulter, США), после их предварительного осаждения с помощью ультрацентрифугирования на центрифуге Sorvall MX 150 Micro-Ultracentrifuge (Thermo Scientific, США) при 100000g, в течение 60 мин [10]. Стандартизация числа эМВ в пробах проводилась путем разбавления образцов и доведения количества МВ до 5000 ± 512 в мкл.

При исследовании индуцированной и спонтанной агрегации тромбоцитов их число в ОТП стандартизовали, добавляя в неё бестромбоцитарную плазму до достижения концентрации тромбоцитов $200—250 \times 10^9/л$.

Спонтанную (поток-индуцированную) агрегацию тромбоцитов исследовали на приборе собственной конструкции [11], в котором использован принцип, предложенный Н. Schmid-Schonbein et al. [12]. В данном приборе клетки крови помещают между двумя плоскостями пластинами, вращающимися навстречу друг другу. Спонтанную агрегацию тромбоцитов оценивали в условиях сдвигового потока с видеозаписью процесса агрегации и последующей компьютерной обработкой полученных микрофотоснимков. Оценка процесса спонтанной агрегации тромбоцитов проводилась по следующим показателям:

1. Степень агрегации — по суммарной максимальной интегральной оптической плотности тромбоцитарных агрегатов (усл.ед.) — M_a .

2. Скорость агрегации — по суммарной интегральной оптической плотности тромбоцитарных агрегатов через 180 с после начала процесса агрегации (усл.ед.) — A_{180} .

Индукцированная АДФ (2×10^5 М) агрегация тромбоцитов исследовалась на агрегометре по методу С. Born (1962) [13]. При этом оценивали:

1. Степень агрегации — по максимальной амплитуде агрегатограммы (мм) — M_a .

2. Скорость агрегации — по амплитуде агрегатограммы через 20 с, после начала процесса агрегации (мм) — A_{20} .

Определяли антитромбиновую активность (АТА) в МВ клотинговым методом по U. Abildgaard (НПО «Ренам», Россия) на коагулометре Sticker Coagulometer BC1 (Германия) [14].

Принцип метода заключается в определении времени образования сгустка фибрина в смеси, содержащей раствор гепарина в имидазоловом буфере (рН 8,2), тромбина, фибриногена и суспензию МВ. Регистрировали время с момента добавления фибриногена до образования сгустка при +37°C. В контроле вместо суспензии эМВ использовали трис-НС1 буфер.

Оценивали также влияние эМВ на время образования фибринового сгустка в отсутствии гепарина. Смесь, содержащую суспензию эМВ и тромбин, до добавления раствора фибриногена инкубировали в течение 2 ч. После этого добавляли раствор фибриногена и определяли время фибринообразования. В контроле вместо суспензии эМВ использовали трис-НС1 буфер. Регистрировали время с момента добавления фибриногена до образования сгустка при +37°C на коагулометре.

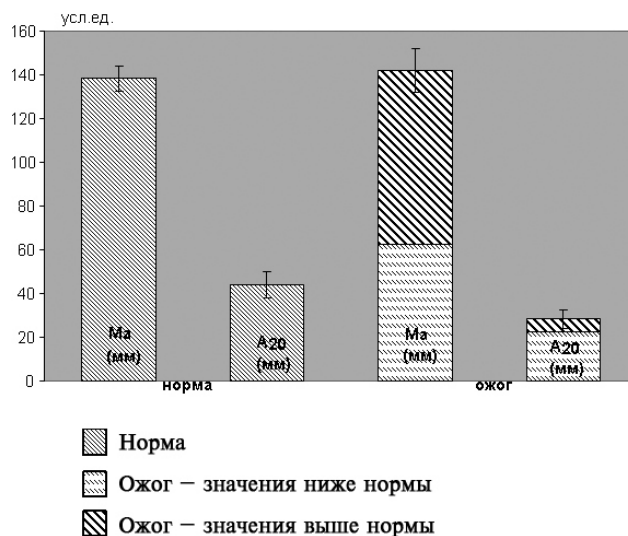
Результаты исследований обработаны с использованием методов непараметрической статистики с применением критерия парных сравнений Вилкоксона и Манна — Уитни при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

Как показали проведенные исследования, ожоговая травма вызывает разнонаправленные изменения АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов (рисунок).

Скорость агрегации в 80% случаев была ниже нормы, а степень — в 56% случаев — выше нормы. Не изменяли эМВ статистически значимо также АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов в ОТП как здоровых доноров, так и ожоговых больных. Спонтанная агрегация тромбоцитов у ожоговых больных, напротив, практически во всех случаях характеризовалась резким увеличением как скорости, так и степени (табл.1).

Как показали проведенные исследования, эМВ в значительной степени угнетали спонтанную агрегацию тромбоцитов в ОТП здоровых доноров, причем антиагрегационное действие МВ, выделенных из эритроцитов здоровых людей, было существенно выше, чем эМВ ожоговых больных. Если под влиянием эМВ, выделенных из крови ожоговых больных, скорость агрегации тромбоцитов в плазме снижалась по сравнению с контролем на 21%, а степень на 14%,



Изменение АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в ранний период ожоговой болезни.

то под влиянием эМВ, выделенных из крови здоровых доноров, скорость агрегации снижалась на 31%, а степень — на 19% (табл. 2).

Изменение спонтанной агрегации тромбоцитов в острый период ожоговой болезни

Таблица 1

Показатели	Норма	Ожог
Ma (усл.ед.)	466,72 ± 56,95	1063,14 ± 96,41 **
A ₁₈₀ (усл.ед.)	106,05 ± 19,92	450,74 ± 54,01 **

Примечание. ** — p<0,001, критерий Манна — Уитни

Изменение спонтанной агрегации тромбоцитов под действием эритроцитарных микровезикул

Таблица 2

	MA (усл.ед.)	A ₁₈₀ (усл.ед.)
Плазма здорового донора + трис-буфер	1754,68 ± 123,5	1509,15 ± 133,9
Плазма здорового донора + эМВ здорового донора	1430,31 ± 145,5*	1044,04 ± 158,6*
Плазма здорового донора + эМВ ожогового больного	1503,63 ± 130,1*	1186,11 ± 186,9*
Плазма ожогового больного + трис-буфер	2342,67 ± 136,3	2059,75 ± 122,8
Плазма ожогового больного + эМВ здорового донора	1774,72 ± 149,8#	1163,64 ± 179,8#
Плазма ожогового больного + эМВ ожогового больного	1884,64 ± 101,3#	1644,34 ± 132,4#&

Примечание. * — p<0,05; сравнение с контролем (плазма здорового донора и трис-буфер); # — p<0,05 — сравнение с контролем (плазма ожогового больного с трис-буфером); & — p<0,05; сравнение с исследованием плазмы ожогового больного и МВ ожогового больного; критерий Вилкоксона

Антитромбиновая активность в эритроцитарных микровезикулах по U. Abildgaard

Таблица 3

	Кровь здоровых доноров		Кровь ожоговых больных	
	Контроль	МВ	Контроль	МВ
Опыт с гепарином, с	17,4 ± 0,36	23,8 ± 0,59*	17,7 ± 0,26	19,3 ± 0,31*
Опыт без гепарина, с	16,8 ± 0,38	28,4 ± 1,02*	16,8 ± 0,52	24,6 ± 0,61*

Примечание. * — p<0,05; сравнение с контролем, критерий Вилкоксона

Такое же действие эМВ на спонтанную агрегацию тромбоцитов было выявлено и при использовании плазмы ожоговых больных. У ожоговых больных эМВ снижали агрегацию тромбоцитов в меньшей степени, по сравнению с эМВ здоровых доноров. (табл. 2).

При исследовании АТА в эМВ нами установлено, что они замедляли время образования сгустка фибрина из фибриногена в присутствии экзогенного тромбина и гепарина (табл. 3). Выявлена разница в действии на процесс фибринообразования (в условиях активации АТ гепарином) МВ, полученных из эритроцитов ожоговых больных и здоровых доноров. Установлено, что замедление образования сгустка фибрина более выражено при использовании МВ, выделенных из эритроцитов здоровых доноров. Если МВ из эритроцитов ожоговых больных замедляли этот процесс всего на 9%, то эМВ здоровых доноров — на 34%.

Кроме того, изучали АТА эМВ в опытах, в которых в качестве ее катализатора гепарин не использовали. Известно, что АТ без гепарина вызывает медленно прогрессирующее торможение тромбина, максимум которого достигается через 2 ч инкубации АТ и тромбина. Это время инкубации и использовали в данной серии исследований. Установлено, что МВ, выделенные из эритроцитов ожоговых больных, в опытах без использования гепарина, замедляли время фибринообразования в среднем на 46% (табл. 3). Действие эМВ, выделенных из крови здоровых доноров, на процесс фибринообразования без использования гепарина было выражено сильнее и составляло 69%. Можно отметить, что в опытах без гепарина степень замедления фибринообразования под влиянием эМВ была большей (в среднем 69%), чем в опытах с использованием гепарина (в среднем 37%).

Известно, что в острые периоды ожоговой болезни наблюдается выраженная гиперкоагуляция — в крови появляется большое количество активированных факторов свертывания крови, тромбин-антитромбиновых комплексов, увеличивается концентрация фибриногена и D-димеров, снижается уровень анти-тромбинов [15]. В развитии постожоговой тромбофилии, как показано нами, важную роль играет значительное увеличение спонтанной агрегации тромбоцитов [6]. Значимость эМВ в этом процессе остается неизученной.

Как свидетельствуют результаты проведенных нами исследований, в острый период ожоговой болезни значительно увеличивается количество МВ в крови больных. Это может быть связано с двумя основными причинами — увеличением самой везикуляции и со снижением процесса утилизации МВ [16]. Влияние эМВ на гемостаз, в том числе и на первичный ге-

мостаз, может быть обусловлено изменением не только их количества, но и их свойств, о чем свидетельствуют результаты проведенных нами исследований, в которых количество МВ в пробах было стандартизовано.

Установлено, что эМВ здоровых доноров обладают антиагрегационным действием — они снижают как скорость, так и степень спонтанной агрегации тромбоцитов.

Процесс агрегации тромбоцитов связан с достаточно сложными молекулярными взаимодействиями, которые развиваются в ходе реакции активации после стимуляции тромбоцитов растворимыми агонистами [17, 18]. Принципиально важную роль в этих процессах играет тромбин. Он представляет собой трипсиноподобную сериновую протеиназу с уникальными свойствами. Молекула тромбина наряду с классическим активным центром имеет дополнительный центр связывания — узнавания субстратов и рецепторов, содержащих аминокислотную последовательность Arg-Gly-Asp. Благодаря наличию в молекуле тромбина двух субсайтов — анионсвязывающий экзосайт 2, называемый участком связывания гепарина, и анионсвязывающий экзосайт 1, называемый также участком узнавания фибриногена — тромбин способен связываться с отрицательно заряженными клеточными мембранами [19—21].

Известно, что образование МВ связано с дестабилизацией липидного комплекса мембраны родительской клетки и переходом ФС на внешнюю поверхность мембраны. Можно полагать, что снижение спонтанной агрегации тромбоцитов под действием эритроцитарных МВ обусловлено тем, что имеющиеся на их мембранах ФС кластеры, несущие отрицательный заряд, предоставляют поверхность для связывания с анионсвязывающими экзосайтами молекулы тромбина. При этом тромбин может терять способность активировать тромбоциты через PAR рецепторы. Потеря тромбином способности активировать тромбоциты при его взаимодействии с МВ эритроцитов может быть вызвана двумя факторами: во-первых, анионсвязывающие экзосайты тромбина, связываясь с отрицательно заряженными мембранами МВ эритроцитов, уже не имеют возможности взаимодействовать с PAR рецепторами тромбоцитов; во-вторых, анионсвязывающие экзосайты молекулы тромбина рассматриваются некоторыми исследователями как аллостерические центры, изменяющие свойства тромбина при его связывании с определенными эффекторами [22]. Таким образом, возможно, что взаимодействие хотя бы одного из анионсвязывающих экзосайтов тромбина с ФС кластерами МВ эритроцитов приводит к инактивации всей молекулы тромбина как агониста тромбоцитарной агрегации.

Процесс инактивации, по-видимому, обусловлен также наличием антитромбинов на поверхности МВ, что и показано в наших исследованиях. АТА эритроцитарных МВ может быть обусловлена двумя факторами — присутствием на их мембранах гепарин-зависимых и гепарин независимых ингибиторов, а также свойствами мембраны, на поверхности которой могут не только формироваться теназные и протромбиназные комплексы, но и изменяться способность тромбина расщеплять фибриноген. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что торможение фибринообразования МВ более выражено в опытах без гепарина, причем после предварительной инкубации тромбина с эритроцитами или МВ. Медленно прогрессирующим антитромбиновым действием обладают антитромбин (если он не активирован гепарином) и α_2 макроглобулин, что показано еще в 1978 году [23].

В присутствии гепарина проявляется и быстро прогрессирующая инактивация тромбина, что свидетельствует о наличии на мембране МВ гепарин-зависимых ингибиторов, прежде всего — антитромбина и кофактора гепарина II. В связи с использованием нами человеческого тромбина разделить влияние того или другого ингибитора на АТА не удается, хотя известно, что сродство к гепарину у кофактора гепарина II на порядок ниже, чем у антитромбина [24]. Определенную роль в общей АТА МВ могут играть и свойства самой мембраны, в частности — наличие на ее поверхности ФС. Еще в 1976 году было показано, что ФС тормозит реакцию тромбин-антитромбин, образуя устойчивый комплекс с тромбином и с субстратом-фибриногеном [25]. Нельзя исключить усиление сорбции тканевого фактора на мембранах МВ именно при ожоговой болезни, при которой повреждение тканей сопровождается выбросом в кровотоки большого количества тканевого фактора. При этом на фосфолипидных мембранах МВ образуется большое количество активных комплексов тканевого фактора с VII [26]. Учитывая, что образование МВ связано с дестабилизацией липидного комплекса мембраны родительской клетки, в результате которого происходит перераспределение фосфолипидов, можно полагать, что оно во многом определяет АТА эритроцитарных МВ. АТА в МВ, выделяемых из эритроцитов ожоговых больных, особенно при ее активации гепарином, меньшая, чем в выделяемых из эритроцитов здоровых доноров. Это может быть связано с рядом факторов: во-первых, более низкая АТА может определяться повышенной генерацией тромбина при ожоговой болезни, и, как следствие, большим связыванием антитромбинов, во-вторых, снижение содержания антитромбинов в плазме крови может приводить к связыванию их в меньшем количестве с мембранами эритроцитов, в-третьих, наличие гепариноте-

рапии в острый период ожоговой болезни приводит к связыванию антитромбинов.

Вероятнее всего, именно снижением АТ активности в МВ, выделенных из эритроцитов ожоговых больных, обусловлен значительно меньший антиагрегационный эффект этих микровезикул. Выявлена четкая корреляция этих процессов при ожоговой болезни.

АДФ индуцированная агрегация тромбоцитов имеет совершенно иной механизм развития. Освобождаясь из активированных клеток (плотных гранул тромбоцитов), АДФ взаимодействует со специфическими пуриновыми рецепторами на тромбоцитах и может вызывать обратимую и необратимую агрегацию в зависимости от концентрации агониста. При действии небольших концентраций АДФ происходит обратимая агрегация, которая ведет к изменению формы клеток и экспонированию на поверхность интегринов α_{IIb}/β_3 , связывающих фибриноген. Необратимая агрегация, вызываемая более высокими концентрациями АДФ, приводит к реакции высвобождения. Эта реакция обеспечивается взаимодействием АДФ с другим членом семейства пуриновых рецепторов — P2Y₁₂, связанным с белком G_i.

Судя по полученным нами данным, эМВ не вызывают существенных изменений в процессе АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов ни в норме, ни при ожоговой болезни.

Заключение

Таким образом, нами установлено, что антиагрегационное действие эМВ на тромбоциты значительно менее выражено у ожоговых больных. Важной причиной этого является снижение АТ активности МВ, выделенных из эритроцитов ожоговых больных. Можно заключить, что снижение «защитного» действия эМВ (антиагрегационного и антитромбинового) при ожоговой болезни, происходящего на фоне их высокой прокоагулянтной активности и увеличения их концентрации в крови, способствует развитию постожоговой тромбофилии.

Список литературы

1. Innes D., Sevitt S. Coagulation and fibrinolysis in injured patients. *J. Clin. Pathol.* 1964; 17(1): 1-13.
2. Arturson G. Forty years in burns research — the postburn inflammatory response. *Burns.* 2000; 26: 599-604.
3. Lavrentieva A., Kontakiotis T., Bitzani M., Papaioannou-Gaki G., Parlapani A., Thomareis O., et al. Early coagulation disorders after severe burn injury: impact on mortality. *Intensive Care Med.* 2008; 34: 700-6.
4. Fang C.H., Li B.G., Wray C.J., Hasselgren P.O. Insulin-like growth factor-I inhibits lysosomal and proteaso-

me-dependent proteolysis in skeletal muscle after burn injury. *J. Burn Care Rehabil.* 2002; 23(5): 318-25.

5. Eurenus K., Rossi T.D., McEuen D.D., Arnold J., McManus W.F. Blood Coagulation in Burn Injury. *Exp. Biol. Med.* 1974; 147: 878-82.

6. Levin G.Y., Egorihina M.N. The role of fibrinogen in aggregation of platelets in burn injury. *Burns.* 2010; 36: 806-10.

7. Rubin O., Crettaz D., Tissot J.-D., Lion N. Microparticles in stored red blood cells: submicron clotting bombs? *Blood Transfus.* 2010; 8: 31-8.

8. Distler J.H., Huber L.C., Hueber A.J., Reich C.F., Gay S., Distler O., et al. The release of microparticles by apoptotic cells and their effects on macrophages. *Apoptosis.* 2005; 10: 731-41.

9. Dey-Hazra E., Hertel B., Kirsch T., Woywodt A., Lovric S., Haller H., et al. Detection of circulating microparticles by flow cytometry: influence of centrifugation, filtration of buffer, and freezing. *Vasc. Health Risk Manag.* 2010; 6: 1125-33.

10. Chung S.M., Bae O.N., Lim K.M., Noh J.Y., Lee M.Y., Jung Y.S., et al. Lysophosphatidic acid induces thrombogenic activity through phosphatidylserine exposure and procoagulant microvesicle generation in human erythrocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27: 414-21.

11. Левин Г.Я., Модин А.П., Кудрицкий С.Ю., Соснина Л.Н. Устройство для исследования агрегации тромбоцитов. Патент 22783816 РФ; 2006.

12. Schmid-Schonbein H., Gosen J.V., Heinrich L., Klose H.J., Volger E. Counterrotating "rheoscope chamber" for the study of the microrheology of blood cell aggregation by microscopic observation and microphotometry. *Microvasc. Res.* 1973; 6: 366-76.

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

14. Abildgaard U. Biological action and clinical significance of antithrombin III. *Haematologia.* 1984; 17(1): 77-9.

15. Garcia-Avello A., Lorente J.A., Cesar-Perez J., Garcia-Frade L.J., Alvarado R., Arevalo J.M., et al. Degree of hypercoagulability and hyperfibrinolysis is related to organ failure and prognosis after burn trauma. *Thromb. Res.* 1998; 89(2): 59-64.

16. Pham T.N., Warren A.J., Phan H.H., Molitor F., Greenhalgh D.G., Palmieri T.L. Impact of tight glycemic control in severely burned children. *J. Trauma.* 2005; 59(5): 1148-54.

17. Струкова С.М. Роль тромбоцитов и сериновых протеаз в сопряжении свертывания крови и воспаления. *Биохимия.* 2004; 69(10): 1314-31.

18. Siss W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiological Reviews.* 1989; 69(1): 58-178.

19. Струкова С.М. Тромбин — регулятор процессов воспаления и репарации тканей. *Биохимия.* 2001; 66(1): 14-27.

20. Fenton J.W. Thrombin functions and antithrombotic intervention. *Thromb. Haemost.* 1995; 74: 493-98.

21. Stubbs M.T., Bode W. A player of many parts: the spotlight falls on thrombin's structure. *Thromb. Res.* 1993; 69(1): 1-58.

22. Струкова С.М., Киреева Е.Г., Дугина Т.Н. Механизмы взаимодействия тромбина с клетками. Взаимодействие тромбина с клетками эндотелия, тучными и другими. *Вестник МГУ. Биология.* 1997; 1: 8-13.

23. Abildgaard U. Evidence that antithrombin III is the main physiological inhibitor of coagulation enzymes. In: *The*

physiological inhibitors of blood coagulation and fibrinolysis. 1979. North-Holland: Elsevier, Biomedical Press; 1979: 31-3.

24. Rau J.C., Beaulieu L.M., Huntington J.A., Church F.C. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J. Thromb. Haemost.* 2007; 5(1): 102-15.

25. Мухачева И.А. Липоидный антикоагулянт, свойства, противосвертывающее начало, механизм влияния на гемокоагуляцию: Дис. автореф. канд. биол. наук. М.; 1976. 23 с.

26. Neuschwander P.F., Bianco-Fisher E., Rezaie A.R., Morrissey J.H. Phosphatidylethalamine augments factor VIIa-tissue factor activity: enhancement of sensitivity to phosphatidylserine. *Biochemistry.* 1995; 34(43): 13988-93.

Поступила 23.06.15

References

1. Innes D., Sevt S. Coagulation and fibrinolysis in injured patients. *J. Clin. Pathol.* 1964; 17(1): 1-13.

2. Arturson G. Forty years in burns research — the postburn inflammatory response. *Burns.* 2000; 26: 599-604.

3. Lavrentieva A., Kontakiotis T., Bitzani M., Papaioannou-Gaki G., Parlapani A., Thomareis O., et al. Early coagulation disorders after severe burn injury: impact on mortality. *Intensive Care Med.* 2008; 34: 700-6.

4. Fang C.H., Li B.G., Wray C.J., Hasselgren P.O. Insulin-like growth factor-I inhibits lysosomal and proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle after burn injury. *J. Burn Care Rehabil.* 2002; 23(5): 318-25.

5. Eurenus K., Rossi T.D., McEuen D.D., Arnold J., McManus W.F. Blood Coagulation in Burn Injury. *Exp. Biol. Med.* 1974; 147: 878-82.

6. Levin G.Y., Egorihina M.N. The role of fibrinogen in aggregation of platelets in burn injury. *Burns.* 2010; 36: 806-10.

7. Rubin O., Crettaz D., Tissot J.-D., Lion N. Microparticles in stored red blood cells: submicron clotting bombs? *Blood Transfus.* 2010; 8: 31-8.

8. Distler J.H., Huber L.C., Hueber A.J., Reich C.F., Gay S., Distler O., et al. The release of microparticles by apoptotic cells and their effects on macrophages. *Apoptosis.* 2005; 10: 731-41.

9. Dey-Hazra E., Hertel B., Kirsch T., Woywodt A., Lovric S., Haller H., et al. Detection of circulating microparticles by flow cytometry: influence of centrifugation, filtration of buffer, and freezing. *Vasc. Health Risk Manag.* 2010; 6: 1125-33.

10. Chung S.M., Bae O.N., Lim K.M., Noh J.Y., Lee M.Y., Jung Y.S., et al. Lysophosphatidic acid induces thrombogenic activity through phosphatidylserine exposure and procoagulant microvesicle generation in human erythrocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27: 414-21.

11. Levin G.Y., Modin A.P., Kudritsky S.Y., Sosnina L.N. *Device for researching platelet aggregation.* Patent 22783816, RF; 2006. (in Russian)

12. Schmid-Schonbein H., Gosen J.V., Heinrich L., Klose H.J., Volger E. Counterrotating "rheoscope chamber" for the study of the microrheology of blood cell aggregation by microscopic observation and microphotometry. *Microvasc. Res.* 1973; 6: 366-76.

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

14. Abildgaard U. Biological action and clinical significance of antithrombin III. *Haematologia*. 1984; 17(1): 77-9.
15. Garcia-Avello A., Lorente J.A., Cesar-Perez J., Garcia-Frade L.J., Alvarado R., Arevalo J.M., et al. Degree of hypercoagulability and hyperfibrinolysis is related to organ failure and prognosis after burn trauma. *Thromb. Res*. 1998; 89(2): 59-64.
16. Pham T.N., Warren A.J., Phan H.H., Molitor F., Greenhalgh D.G., Palmieri T.L. Impact of tight glycemic control in severely burned children. *J. Trauma*. 2005; 59(5): 1148-54.
17. Strukova S.M. Role of platelets and serine proteinases in coupling of blood coagulation and inflammation. *Biokhimiya*. 2004; 69(10): 1314-31. (in Russian)
18. Siss W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiological Reviews*. 1989; 69(1): 58-178.
19. Strukova S.M. Thrombin as a regulator of inflammation and reparative processes in tissues. *Biokhimiya*. 2001; 66(1): 14-27. (in Russian)
20. Fenton J.W. Thrombin functions and antithrombotic intervention. *Thromb. Haemost.* 1995; 74: 493-98.
21. Stubbs M.T., Bode W. A player of many parts: the spotlight falls on thrombin's structure. *Thromb. Res*. 1993; 69(1): 1-58.
22. Strukova S.M., Kireeva E.G., Dugina T.N. Mechanisms of thrombin-cellular interaction. Interaction of thrombin with endothelial cells, mast cells and others. *Vestnik MGU. Biologiya*. 1997; 1: 8-13. (in Russian)
23. Abildgaard U. Evidence that antithrombin III is the main physiological inhibitor of coagulation enzymes. In: *The physiological inhibitors of blood coagulation and fibrinolysis*. 1979. North-Holland: Elsevier, Biomedical Press; 1979: 31-3.
24. Rau J.C., Beaulieu L.M., Huntington J.A., Church F.C. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J. Thromb. Haemost.* 2007; 5(1): 102-15.
25. Mukhacheva I.A. *Lipoid anticoagulant, properties, anticoagulant beginning, mechanism of influence on hemocoagulation* diss. avtoref. Moscow; 1976. 23 p. (in Russian)
26. Neuenschwander P.F., Bianco-Fisher E., Rezaie A.R., Morrissey J.H. Phosphatidylethanolamine augments factor VIIa-tissue factor activity: enhancement of sensitivity to phosphatidylserine. *Biochemistry*. 1995; 34(43): 13988-93.

Received 23.06.15

Сведения об авторах:

Сухарева Екатерина Геннадьевна — мл. науч. сотр. отделения гравитационной хирургии и гемодиализа, e-mail: ekaterina.syhareva@gmail.com

Коненков В.И., Бородин Ю.И., Макарова О.П., Бгатова Н.П., Рачковская Л.Н.

Влияние наноразмерных частиц карбоната лития на образование оксида азота и активность аргиназы в опухоли и перитонеальных макрофагах при развитии гепатокарциномы 29

ФБГНУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии, 630117, г. Новосибирск, ул. акад. Тимакова, д. 2

В эксперименте использовано 3 группы мышей-самцов СВА. В 1-ю группу вошли интактные мыши, во 2-ю группу — животные, которым трансплантировали клетки гепатокарциномы 29 (Г-29) в мышцу правого бедра. Мышам 3-й группы после инокуляции опухолевых клеток вводили 1-кратно (3 сут.) и 5-кратно (7 и 13 сут.) 0,1 мл взвеси наноразмерных частиц карбоната лития (НЧ Li_2CO_3) в дозе 0,058 мг по периферии опухолевого роста. На 7 сут. в опухолевой ткани в 5,8 раза увеличивалась численная плотность макрофагов, в 1,9 раза повышался уровень NO, и снижалась активность аргиназы по сравнению с аналогичными показателями в нормальной печени. Рост опухоли приводил к повышению продукции NO перитонеальными макрофагами (пМф) в 2,8 и 2,2 раза на 7 сут. и 13 сут. соответственно и не влиял на активность аргиназы. Однократное введение НЧ Li_2CO_3 после индукции опухолевого процесса (3 сут.) не меняло уровня NO в ткани Г-29, но после пятикратного введения (7 сут.) концентрация NO в опухоли была в 1,7 раза выше, чем у животных 2 группы. Инъекции НЧ Li_2CO_3 способствовали нарастанию численной плотности макрофагов в опухоли. На 7 сут. после 5-кратного введения НЧ Li_2CO_3 численность макрофагов у мышей 3 группы увеличивалась в 9,6 и 1,6 раза по сравнению с аналогичными значениями в 1-й и 2-й группах соответственно. Введение НЧ Li_2CO_3 после трансплантации клеток Г-29 в мышечную ткань не влияло на интенсивность образование NO пМф при развитии опухоли. Кроме того, введение НЧ Li_2CO_3 после инициации Г-29 в мышечной ткани бедра не влияло на активность аргиназы в пМф на всех сроках исследования. Таким образом, эффекты НЧ Li_2CO_3 , вводимых после трансплантации опухолевых клеток Г-29, направлены на усиление NO-синтазного пути в опухоли и макрофагах перитонеальной полости, что может способствовать снижению концентрации аргинина, необходимого для роста гепатокарциномы.

Ключевые слова: гепатокарцинома; наноразмерные частицы; карбонат лития; макрофаги; оксид азота; аргиназа

Konenkov V.I., Borodin Yu.I., Makarova O.P., Bgatova N.P., Rachkovskaya L.N.

Effects of lithium carbonate nanosized particles on nitric oxide production and arginase activity in tumor and peritoneal macrophages in hepatocellular carcinoma 29

Federal State Budgetary Institution «Scientific Institution of Clinical and Experimental Lymphology», 2, Timakoff St., Novosibirsk, Russia, 630117

Three groups of male CBA mice were used. Group 1 consisted of intact mice. Hepatocarcinoma cells 29 (HCC-29) were transplanted into the right thigh muscle of animals group 2. Group 3 mice were injected 0.1 ml of lithium carbonate nanosized particles (NPs Li_2CO_3) at a dose of 0,058 mg on periphery of tumor growth one fold (3 day) and 5 -fold (7 and 13 days). On day 7, numerical density of macrophages was raised in 5.8 times, the NO levels were increased by 1.9 times, and arginase activity was decreased in HCC tissue as compared with those values in normal liver. Tumor growth led to an increase in NO production by peritoneal macrophages (pMf) in 2.8 and 2.2-fold on day 7 and 13 days, respectively, and hadn't effect on arginase activity. A single injection of NPs Li_2CO_3 after inoculation tumor cells (3 days) didn't alter the NO levels rise in the tumor but five injections (7 days) increased it in 1.7 times as compared with values of mice group 2. The treatment of NPs Li_2CO_3 influenced the increasing the number density of macrophages in the tumor. Numerical density of macrophages in the tumor of mice group 3 was increased 9.6 and 1.6 times as compared with similar values in groups 1 and 2, respectively on 7 day after 5 injections of NPs Li_2CO_3 . Treatment of NPs Li_2CO_3 after tumor cell transplantation didn't affect on the rise of NO levels and arginase activity in pMf. Thus, the effects of NPs Li_2CO_3 , administered after HCC-29 cells transplantation, aimed at increasing activity of the NO-synthase way in HCC tumors and pMf, which can reduce the arginine levels required for tumor growth.

Keywords: hepatocarcinoma; nanosized particles; lithium carbonate; macrophages; nitric oxide; arginase

Методика

Аргинин способствует росту опухолей, и ферментативное разрушение этой незаменимой аминокислоты, опосредованное аргиназой может привести к подавлению пролиферации и гибели опухолевых клеток [1]. За аргинин конкурируют между собой аргиназный и NO-синтазный метаболические пути. Активация NO-синтазного метаболического пути в опухоли может способствовать элиминации раковых клеток. Показано, что совместное использование 5-фторурацила и L-аргинина у мышей nude с гепатокарциномой приводит к усилению экспрессии индуцибельной NO-синтазы, повышению продукции NO в опухоли, что способствует увеличению экспрессии генов белков, индуцирующих апоптоз опухолевых клеток [2], а применение ингибитора NO-синтазы L-NAME снижает эффект противоопухолевой терапии [3]. Гепатокарцинома относится к аргинин-зависимым опухолям, и рекомбинантные ферменты, разрушающие L-аргинин, аргиназа и аргиназная деиминаза зарекомендовали себя, как противоопухолевые агенты в отношении гепатокарциномы [4, 5].

Известно, что гепатокарцинома активно инфильтрируется макрофагами, которые поддерживают хронический воспалительный процесс необходимый для прогрессирования опухолевого процесса [6]. В основе фенотипической функциональной поляризации макрофагов также лежит соотношение между альтернативными путями метаболизма аргинина — NO-синтазным и аргиназным, которое определяет их способность стимулировать клеточные (Th1-зависимые) или гуморальные (Th2-зависимые) иммунные реакции [7]. В связи с этим вещества, изменяющие этот баланс, могут быть использованы для модуляции противоопухолевого иммунного ответа.

Недавно обнаружено, что в регуляции NO-синтазы и продукции NO в нормальных гепатоцитах и различных линиях гепатокарцином играет важную роль Wnt/beta-catenin сигнальный путь, состояние которого селективно регулируется хлоридом лития [8]. Показано, что соли лития обладают иммуномодулирующими свойствами [9]. Наноразмерные частицы карбоната лития (НЧ Li_2CO_3) доступны для фагоцитоза, поскольку НЧ обладают высокоразвитой активной поверхностью, высокой сорбционной емкостью и благодаря своим размерам могут взаимодействовать и связываться с ними [10].

В связи с этим целью данного исследования является изучение продукции оксида азота и активности аргиназы в опухоли и перитонеальных макрофагах при развитии гепатокарциномы 29 (Г-29) в условиях введения НЧ Li_2CO_3 .

Исследование проведено на мышках-самцах линии СВА массой 18—20 г в возрасте 3 месяцев. Животных содержали на стандартной диете со свободным доступом к воде и пище. Работу с животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». В эксперименте использовано 3 группы животных. В 1 группу вошли интактные мыши. У животных 2 группы опухолевый процесс индуцировали инокуляцией клеток Г-29. Г-29 получена и верифицирована сотрудниками Института цитологии и генетики СО РАН [11] и любезно предоставлена для нашего исследования. Клетки Г-29 перевивали мышам линии СВА в брюшную полость, через 10 сут. забирали асцитическую жидкость, разводили в 10-кратном объеме 0,85% раствора NaCl и вводили по 0,1 мл интактным животным в мышцу правого бедра. Животным 3 группы после индукции опухолевого процесса вводили 1-кратно (3 сут.) и 5-кратно (7 и 13 сут.) 0,1 мл взвеси НЧ Li_2CO_3 в дозе 0,058 мг, приготовленной на стерильном 0,85% водном растворе NaCl. НЧ Li_2CO_3 диаметром 10—20 нм были получены путем механоактивации образцов в мельнице-активаторе планетарного типа АГО-2С (разработка ИХТТМ СО РАН, г. Новосибирск) при частоте вращения барабанов — 1820 об/мин¹ и центробежном ускорении — 400 м/с². Мелющими телами являлись стальные шары диаметром 8—10 мм. Масса шаров при загрузке одного барабана — 0,2—0,5 кг, навеска образца — 15—20 г, время обработки — 2 минуты. Перед приготовлением суспензии НЧ простерилизовали нагреванием до 100°C 90 мин. Размер НЧ Li_2CO_3 был определен с помощью электронного микроскопа [12]. Многократное внутримышечное введение было выбрано с целью направленной доставки НЧ Li_2CO_3 к месту инициации опухолевого процесса, что дало возможность использовать препарат в пониженной концентрации и ограничить токсическое влияние лития на почки. Забор материала производили на 3, 7 и 13 сут. после введения опухолевых клеток. Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом методом кранио-цервикальной дислокации. Забор экспериментального материала выполняли в утренние часы.

Макрофаги для исследования получали методом перитонеального лаважа. Внутривенно вводили 7 мл среды 199 с 10 Ед/мл гепарина, через 2 мин культуральную среду, содержащую клетки перитонеального экссудата, извлекали с помощью шприца. Суспензии клеток отмывали средой 199 с 10 Ед/мл

Для корреспонденции: Макарова Ольга Петровна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. ультраструктурных исследований Института клинической и экспериментальной лимфологии СО РАН, e-mail: ormak@ngs.ru

гепарина центрифугированием в течение 10 мин при 1,5 тыс. об./мин. Клеточный осадок, полученный после центрифугирования, ресуспендировали в культуральной среде DMEM/F12, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки, 15 мМ HEPES, 0,3% L-глутамина и 50 мкг/мл гентамицина. Для получения перитонеальных макрофагов (пМФ) клетки вносили в лунки 96-луночного планшета по $2,0 \times 10^5$ в объеме 200 мкл и инкубировали 2 ч (37°C , 5% CO_2), не прилипшую фракцию удаляли, дважды промывали свежей средой и продолжали инкубировать 18 ч. О продукции NO судили по содержанию нитритов в супернатантах клеточных культур. К 100 мкл супернатанта добавляли 100 мкл реактива Грисса, смешивали и через 15 мин измеряли количество продукта реакции на спектрофотометре «SmartSpec Plus» (Bio-Rad, США) при длине волны 540 нм [13].

Активность аргиназы определяли по скорости образования мочевины [14]. Макрофаги лизировали двукратным замораживанием и размораживанием, после чего к 50 мкл лизата добавляли 50 мкл 50 мМ Трис-HCl (pH 7,4) и 10 мкл 50 мМ раствора хлорида марганца. Аргиназу активировали нагреванием в термостате при 57°C в течение 10 мин, создавая влажную среду, смочив предварительно крышку планшета раствором Хэнкса, после чего к пробам добавляли по 100 мкл 0,5 М раствора L-аргинина и инкубировали их в течение 30 мин при 37°C . Реакцию останавливали помещением планшета на лед в холодильную камеру. Концентрацию мочевины определяли с использованием набора «Biosop» (Германия). Количество продукта реакции измеряли на спектрофотометре «SmartSpec Plus» (Bio-Rad, США) при длине волны 340 нм.

Для определения концентрации NO и активности аргиназы образцы опухоли и печени интактных животных гомогенизировали на холоде в гомогенизаторе Поттера в 2 мл 0,85% водного раствора NaCl, содержащего 0,1% ЭДТА, затем центрифугировали 15 мин при 4000 об/мин, супернатанты замораживали при 18°C . Для определения NO гомогенат предварительно депротеинизировали добавлением 10% трихлоруксусной кислоты с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 3000 об/мин. Определение уровней NO и активности аргиназы определяли выше описанными методами.

Для изучения образцов опухолевой ткани в просвечивающем режиме электронного микроскопа их фиксировали в 1% растворе OsO_4 на фосфатном буфере (pH = 7,4), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон. Из полученных блоков готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм, окрашивали толуидиновым синим, изучали под световым микроскопом и выбирали необходимые участки тканей для исследования в электронном микроскопе. Из отобранного материала получали ультратонкие срезы толщиной 35—45 нм на ультратоме Leica EM UC7, контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1010.

Результаты подвергали дисперсионному анализу ANOVA с последующей оценкой межгрупповых отличий по критерию Манна—Уитни.

Результаты и обсуждение

У животных 2-й группы на 7 сут. развития опухолевого процесса в правой мышце бедра после трансплантации клеток Г-29 уровень концентрации

Таблица

Изменение продукции NO и активности аргиназы в нормальной печени и гепатокарциноме при развитии опухолевого процесса в условиях введения наноразмерных частиц карбоната лития (Me, 25%—75%)

Показатели	Сроки исследования		
	3 сут.	7 сут.	13 сут.
1-я группа (8)			
NO (мкмоль/г ткани)	5,4 3,8—6,4		
Аргиназа (мкмоль мочевины/мин/г ткани)	3,04 2,48—4,35		
2-я группа			
NO (мкмоль/г ткани)	8,8 4,1—15,7	10,4* 8,6—11,6	7,6 6,0—12,3
Аргиназа (мкмоль мочевины/мин/г ткани)	0,78* 0,56—1,12 (4)	— (3)	0,18* 0,13—0,21 (3)
3-я группа			
NO (мкмоль/г ткани)	5,0 2,2—31,2	15,4*# 12,6—22,2	8,6 6,3—17,1
Аргиназа (мкмоль мочевины/мин/г ткани)	0,57 0,36—0,68 (4)	— (5)	0,42* 0,25—0,48 (4)

Примечание. * — $P < 0,05$ по сравнению с показателями в 1-й группе животных; # — $p < 0,05$ по сравнению с показателями в 3-й группе животных; в скобках указано количество животных.

NO в опухоли повышался в 1,9 раза по сравнению с уровнем в печени интактных мышей 1-й группы (таблица). По мере роста опухоли Г-29 в ней наблюдали постепенное существенное снижение активности аргиназы: на 3 сут. — в 3,9 раза и к 13 сут. в 16,8 раза по сравнению с уровнем активности этого фермента в нормальной печени (таблица). На 7 сут. в опухолевой ткани в 5,8 раза возрастала численная плотность макрофагов, по сравнению с контролем (рис. 2А).

Метаболические изменения в опухоли, сопровождающие ее рост, отражались на функциональном состоянии макрофагов перитонеальной полости. Так,

у животных 2-й группы после инокуляции опухолевых клеток Г-29 в мышечную ткань правого бедра повышалась способность пМФ образовывать NO (рис. 1А). Однако достоверный рост продукции NO наблюдали позднее к 7 сут., а в опухоли уже на 3 сут. (рис. 1А; таблица). На 7 сут. уровень NO в супернатантах культур пМФ увеличился в 2,8 раза и на 13 сут. — в 2,2 раза по сравнению с уровнем этого медиатора в супернатантах культур пМФ интактных животных 1-й группы (рис. 1А). При этом следует отметить, что увеличение продукции NO пМФ после инициации опухолевого процесса не приводило к изменению активности аргиназы в них (рис. 1Б).

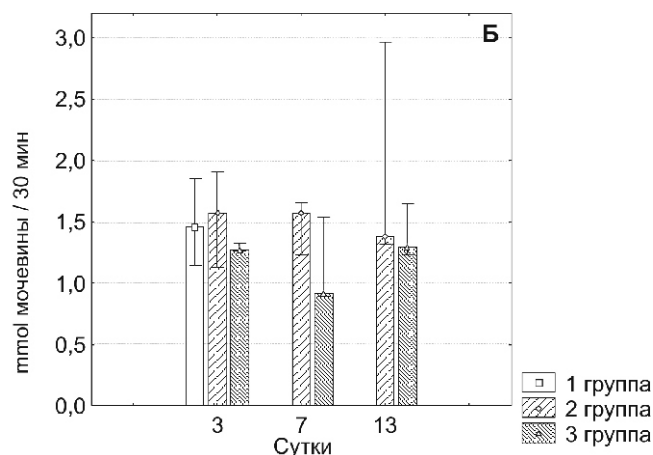
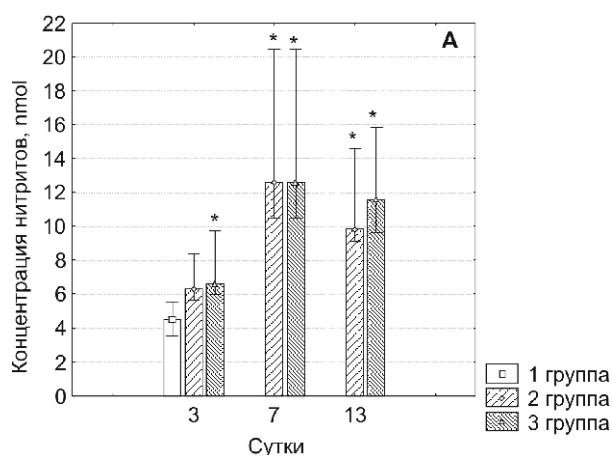


Рис. 1. Изменение показателей продукции NO перитонеальными макрофагами (А) и активности в них аргиназы (Б) при развитии гепатокарциномы 29 в мышечной ткани правого бедра в условиях введения наноразмерных частиц карбоната лития. Ме, 25%-75%; * — $p < 0,05$ по сравнению с 1-й группой интактных животных.

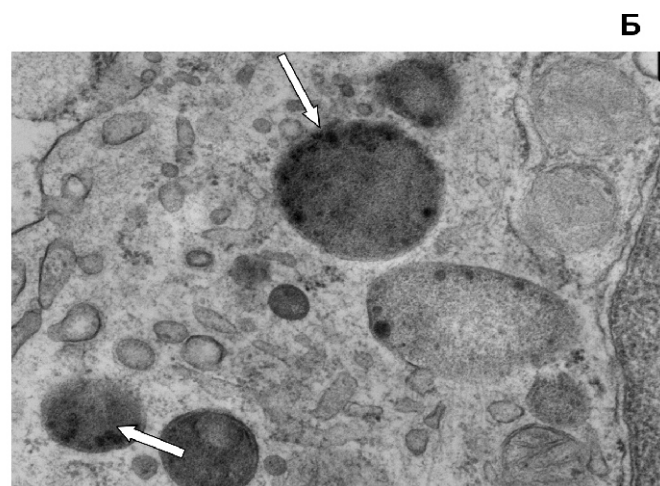
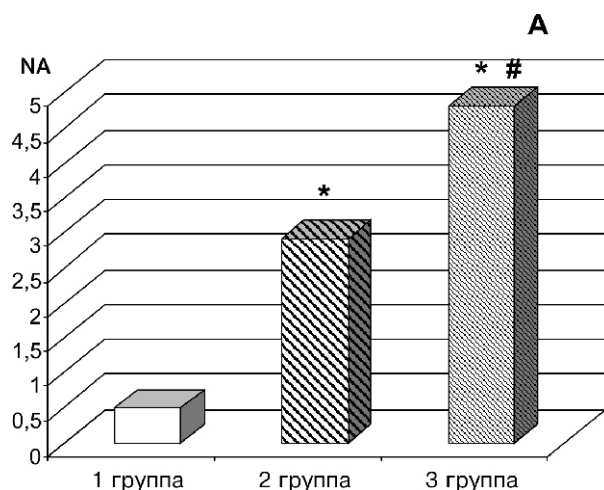


Рис. 2. Изменение численной плотности макрофагов и накопление в их цитоплазме наноразмерных частиц карбоната лития при развитии гепатокарциномы 29 в области бедра на 7-е сутки после пятикратного введения наноразмерных частиц карбоната лития:

А — возрастание численной плотности макрофагов после 5-кратного введения наноразмерных частиц карбоната лития по периферии опухолевого роста;

Б — наноразмерные частицы карбоната лития в фагосоме макрофага (светлые стрелки). Увеличение $\times 15000$.

* — $p < 0,05$ по сравнению с показателями в 1-й группе животных (интактный контроль); # — $p < 0,05$ по сравнению с показателями во 2-й группе животных с гепатокарциномой без введения наноразмерных частиц карбоната лития.

Однократное введение НЧ Li_2CO_3 после индукции опухолевого процесса (3 сут.) не влияло на рост концентрации NO в ткани гепатокарциномы (таблица). Однако после пятикратного введения НЧ Li_2CO_3 на 7 сут. исследования уровень концентрации NO в опухолевой ткани увеличивался в 1,7 раза больше, чем у животных 2-й группы. После одно- и пятикратного введения НЧ Li_2CO_3 уровень активности аргиназы в ткани гепатокарциномы также снижался, как и у мышей 2 группы: на 3 сут. в 5,3 раза, на 7 сут. в 7,2 раза по сравнению с контрольным уровнем в 1-й группе (таблица). При этом снижение активности аргиназы в опухолевой ткани у животных, получавших пятикратные инъекции НЧ Li_2CO_3 , происходило вдвое медленнее, чем у мышей 2-й группы. Так, на 13 сут. у животных 2-й группы уровень активности аргиназы в опухоли снижался 16,8 раза, а у мышей 3-й группы — в 7,2 по сравнению с уровнем активности данного фермента в нормальной печени животных 1-й группы. Следует отметить, что после пятикратного введения НЧ Li_2CO_3 по периферии опухолевого роста макрофаги, присутствующие в опухоли, активно фагоцитировали частицы, наличие которых отмечали в фагосомах при электронной микроскопии (рис. 2Б). При этом происходило возрастание численной плотности макрофагов в опухолевой ткани. На 7 сут. после пятикратного введения НЧ Li_2CO_3 численность макрофагов у мышей 3-й группы увеличивалась в 9,6 и 1,6 раза по сравнению с аналогичными значениями в 1-й и 2-й группах соответственно (рис. 2А).

Динамика увеличения уровня продукции NO пМф у мышей 3-й группы была сходной с таковой у животных 2-й группы (рис. 1А). Ни 2-, ни 5-кратное введение НЧ Li_2CO_3 после трансплантации клеток Г-29 в мышечную ткань не влияло на интенсивность образования NO пМф при развитии опухоли. Кроме того, введение НЧ Li_2CO_3 после инициации Г-29 в мышечной ткани бедра не влияло на активность аргиназы в пМф на всех сроках исследования по сравнению с аналогичными показателями у животных 1-й и 2-й групп (рис. 1Б).

Согласно полученным данным, развитие гепатокарциномы сопровождалось увеличением уровня NO и снижением активности аргиназы в ней. Вклад в повышение продукции NO могла внести миграция макрофагов в локус формирования опухолевого узла, приведшая к многократному увеличению их численной плотности в опухолевой ткани. Известно, что повышенная продукция NO приводит к увеличению внутриопухолевой микроциркуляции и снижению уровня гипоксии [3]. NO регулирует такие критические факторы, как гипоксия-индуцибельный фак-

тор-1 и p53, приводя к торможению роста опухоли и усилению апоптоза опухолевых клеток, а также повышая чувствительность клеток гепатомы к противоопухолевым препаратам [15]. Введение НЧ Li_2CO_3 после индукции гепатокарциномы заметно увеличивало численную плотность макрофагов и уровень продукции NO в опухоли. Показано, что хлорид лития — селективный ингибитор гликоген синтазы киназы 3β повышает уровень β -катенина в цитоплазме и ядре, экспрессию индуцибельной NO-синтазы и продукцию NO в нормальных гепатоцитах человека и крысы и клеточных линиях различных опухолей, включая гепатокарциному [8]. Снижение продукции NO в опухоли может привести к усилению прогрессии и метастазирования гепатокарциномы [16].

Анализ полученных данных свидетельствовал о том, что метаболические изменения в опухолевой ткани сопровождались усилением продукции NO дистантными макрофагами, к которым относятся макрофаги перитонеальной полости. пМф напрямую не принимают участие в развитии опухоли, но согласно современным представлениям эти клетки могут играть роль свидетелей, отражающих системный иммунный ответ на рост опухоли в целом. Недавно обнаружено, что периферические макрофаги не обладают свойствами ни M1, ни M2 фенотипа: показывают обратную регуляцию NF- κ B-зависимых провоспалительных сигнальных путей и продукции ИЛ-12 и не проявляют типичных маркеров M2 фенотипа, а именно повышенной экспрессии ИЛ-10 и аргиназы [17]. Наши данные согласуются с результатами, полученными Kisseleva E.P. et al. [18]. В этом исследовании у мышей после подкожного введения клеток гепатомы 22a в область спины на 3 сут. уровень продукции NO пМф был снижен, но к 7 сут. он существенно превышал контрольные показатели. Согласно нашим данным, в ранний период развития Г-29 (3 сут) пМф продуцируют NO в пределах контрольных значений, а на 7 и 13 сут. значительно больше, но при этом в них не отмечается активации аргиназы. Введение НЧ Li_2CO_3 после индукции гепатокарциномы 29 в мышечной ткани правого бедра, не оказывало влияния на функциональное состояние дистантных пМф и не способствовало поляризации их фенотипа.

Таким образом, эффекты НЧ Li_2CO_3 , вводимых после трансплантации опухолевых клеток Г-29, связаны с усилением NO-синтазного пути в опухолевой ткани и макрофагах перитонеальной полости, что может способствовать снижению концентрации аргинина, необходимого для роста гепатокарциномы.

Список литературы

1. Phillips M.M., Sheaff M.T., Szlosarek P.W. Targeting Arginine-Dependent Cancers with Arginine-Degrading Enzymes: Opportunities and Challenges. *Cancer Res Treat.* 2013; 45(4): 251-62.
2. Yin X.Y., Jiang J.M., Liu J.Y., Zhu J.R. Effects of endogenous nitric oxide induced by 5-fluorouracil and L-Arg on liver carcinoma in nude mice. *World J Gastroenterol.* 2007; 13(46): 6249-53.
3. Nagane M., Yasui H., Yamamori T., Zhao S, Kuge Y, Tamaki N, et al. Radiation-induced nitric oxide mitigates tumor hypoxia and radioresistance in a murine SCCVII tumor model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 437(3): 420-25.
4. Cheng P.N., Lam T.L., Lam W.M., Tsui S.M., Cheng A.W., Lo W.H., et al. Pegylated recombinant human arginase (rhArgpeg5,000mw) inhibits the in vitro and in vivo proliferation of human hepatocellular carcinoma through arginine depletion. *Cancer Res.* 2007; 67(1):309-17.
5. Chow A.K., Ng L., Sing Li H., Cheng C.W., Lam C.S., Yau T.C., et al. Anti-tumor efficacy of a recombinant human arginase in human hepatocellular carcinoma. *Curr Cancer Drug Targets.* 2012; 12(9): 1233-43.
6. Capece D., Fischietti M., Verzella D., Gaggiano A, Ciccirelli G, Tessitore A, et al. The inflammatory microenvironment in hepatocellular carcinoma: a pivotal role for tumor-associated macrophages. *Biomed Res. Int.* 2013, 2013;2013:187204. doi: 10.1155/2013/187204. Epub 2012 Dec 30. Available at: <http://doi.org/10.1155/2013/187204>
7. Михайленко А.А., Коненков В.И., Базанов Г.А., Покровский В.И. *Руководство по клинической иммунологии, аллергологии, иммуногенетике и иммунофармакологии.* М.: Триада; 2005.
8. Du Q., Park K.S., Guo Z., Park K.S., Geller D.A. Regulation of human nitric oxide synthase 2 expression by Wnt beta-catenin signaling. *Cancer Res.* 2006; 6(14): 7024-31.
9. Raghavendra P.B., Lee E., Parameswaran N. Regulation of macrophage biology by lithium: a new look at an old drug. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013; 9(3): 277-84.
10. Salata O.V. Applications of nanoparticles in biology and medicine. Available at: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/2/1/3>
11. Каледин В.И., Жукова Н.А., Николин В.П., Попова Н.А., Беляев М.Д., Багинская Н.В. и др. Гепатокарцинома Г-29 — метастазирующая перевиваемая опухоль мышей, вызывающая кахексию. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2009; 148(12): 664-69.
12. Бгатовая Н.П., Макарова О.П., Пожидаева А.А.Бородин Ю.И., Рачковская Л.Н., Коненков В.И. Биологические эффекты наноразмерных частиц лития. *Успехи наук о жизни.* 2012; 5: 29-46.
13. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 1984; 126(1): 131-8.
14. Corraliza I.M., Campo M.L., Soler G., Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micro-method. *J. Immunol. Methods.* 1994; 174(1-2): 231-5.
15. Muntane J., De la Rosa A.J., Marin L.M., Padillo F.J. Nitric oxide and cell death in liver cancer cells. *Mitochondrion.* 2013; 13(3): 257-62.
16. Zhou L., Wang Y., Tian D.A., Yang J., Yang Y.Z. Decreased levels of nitric oxide production and nitric oxide synthase-2 expression are associated with the development

and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep.* 2012; 6(6): 1261-6.

17. Torroella-Kouri M., Silvera R., Rodriguez D., Caso R, Shatry A, Opiela S, et al. Identification of a subpopulation of macrophages in mammary tumor-bearing mice that are neither M1 nor M2 and are less differentiated. *Cancer Research.* 2009; 69(11): 4800-9.

18. Kisseleva E.P., Lrylov A.V., Stepanova O.I., Liodyno V.I. Transplantable subcutaneous hepatoma 22a affects functional activity of resident tissue macrophages in periphery. *J Cell Biol.* 2011;2011:793034. Article ID 793034, 14 pages. doi:10.1155/2011/793034.

Поступила 10.07.14

References

1. Phillips M.M., Sheaff M.T., Szlosarek P.W. Targeting Arginine-Dependent Cancers with Arginine-Degrading Enzymes: Opportunities and Challenges. *Cancer Res Treat.* 2013; 45(4): 251-62.
2. Yin X.Y., Jiang J.M., Liu J.Y., Zhu J.R. Effects of endogenous nitric oxide induced by 5-fluorouracil and L-Arg on liver carcinoma in nude mice. *World J Gastroenterol.* 2007; 13(46): 6249-53.
3. Nagane M., Yasui H., Yamamori T., Zhao S, Kuge Y, Tamaki N, et al. Radiation-induced nitric oxide mitigates tumor hypoxia and radioresistance in a murine SCCVII tumor model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 437(3): 420-25.
4. Cheng P.N., Lam T.L., Lam W.M., Tsui S.M., Cheng A.W., Lo W.H., et al. Pegylated recombinant human arginase (rhArgpeg5,000mw) inhibits the in vitro and in vivo proliferation of human hepatocellular carcinoma through arginine depletion. *Cancer Res.* 2007; 67(1):309-17.
5. Chow A.K., Ng L., Sing Li H., Cheng C.W., Lam C.S., Yau T.C., et al. Anti-tumor efficacy of a recombinant human arginase in human hepatocellular carcinoma. *Curr Cancer Drug Targets.* 2012; 12(9): 1233-43.
6. Capece D., Fischietti M., Verzella D., Gaggiano A, Ciccirelli G, Tessitore A, et al. The inflammatory microenvironment in hepatocellular carcinoma: a pivotal role for tumor-associated macrophages. *Biomed Res. Int.* 2013, 2013; 2013:187204. doi: 10.1155/2013/187204. Epub 2012 Dec 30. Available at: <http://doi.org/10.1155/2013/187204>
7. Mikchailenko A.A, Konenkov V.I., Bazanov G.A., Pokrovsky V.I. *Handbook of Clinical Immunology, Allergy, Immunogenetics and Immunopharmacology.* Moscow: Triada; 2005 (in Russian)
8. Du Q., Park K.S., Guo Z., Park K.S., Geller D.A. Regulation of human nitric oxide synthase 2 expression by Wnt beta-catenin signaling. *Cancer Res.* 2006; 6(14): 7024-31.
9. Raghavendra P.B., Lee E., Parameswaran N. Regulation of macrophage biology by lithium: a new look at an old drug. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013; 9(3): 277-84.
10. Salata O.V. Applications of nanoparticles in biology and medicine. Available at: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/2/1/3>
11. Kaledin V.I., Zhukova N.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Belyaev M.D., Baginskaya N.V. et al. Hepatocarcinoma-29, a Metastasizing Transplantable Mouse Tumor Inducing Cachexia. *Bull. Experim. Biol. Med.* 2009; 148(12): 664-9. (in Russian)
12. Bgatova N.P., Borodin Yu.I., Makarova V.V., Pozhidaeva A.A., Rachkovskaya L.N., Konenkov V.I. Effects of Nanosized Lithium Carbonate Particles on Intact Muscle

Tissue and Tumor Growth. *Bull. Experim. Biol. Med.* 2014. 157 (1): 102-7. (in Russian)

13. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 1984; 126(1): 131-8.

14. Corraliza I.M., Campo M.L., Soler G., Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micro-method. *J. Immunol. Methods.* 1994; 174(1-2): 231-5.

15. Muntane J., De la Rosa A.J., Marin L.M., Padillo F.J. Nitric oxide and cell death in liver cancer cells. *Mitochondrion.* 2013; 13(3): 257-62.

16. Zhou L., Wang Y., Tian D.A., Yang J., Yang Y.Z. Decreased levels of nitric oxide production and nitric oxide synthase-2 expression are associated with the development

and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep.* 2012; 6(6): 1261-6.

17. Torroella-Kouri M., Silvera R., Rodriguez D., Casso R, Shatry A, Opiela S, et al. Identification of a subpopulation of macrophages in mammary tumor-bearing mice that are neither M1 nor M2 and are less differentiated. *Cancer Research.* 2009; 69(11): 4800-9.

18. Kisseleva E.P., Lrylov A.V., Stepanova O.I., Liodyno V.I. Transplantable subcutaneous hepatoma 22a affects functional activity of resident tissue macrophages in periphery. *J Cell Biol.* 2011; 2011:793034. Article ID 793034, 14 pages. doi:10.1155/2011/793034.

Received 10.07.14

Сведения об авторах:

Коненков Владимир Иосифович, акад. РАН, доктор мед. наук, директор НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАН

Бородин Юрий Иванович, акад. РАН, доктор мед. наук, науч. консультант НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАН

Бгатова Наталия Петровна, доктор биол. наук, проф., руководитель лаб. ультраструктурных исследований Института клинической и экспериментальной лимфологии СО РАН

Рачковская Любовь Никифоровна, канд. хим. наук, руководитель лаб. биологически активных соединений НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАН

Алиева Т.Р., Аллахвердиева Л.И.

Сравнительная характеристика уровня гистамина и иммуноглобулинов класса E и G в крови и лимфе при экспериментальном анафилактическом шоке и феномене Артюса

Азербайджанский медицинский университет, Азербайджан AZ1022, г. Баку, ул. Бакиханова, д. 23

Изучены изменения содержания гистамина и уровней иммуноглобулинов E, G в крови и лимфе при экспериментальном анафилактическом шоке и феномене Артюса. Эксперименты проведены на 27 кроликах породы «Шиншилла» в двух сериях. Контролем служили исследуемые показатели концентрации гистамина и уровней IgE и IgG в крови и лимфе интактных животных. Результаты исследования показали, что при экспериментальном анафилактическом шоке наблюдается повышение уровня IgE и снижение уровня IgG. При феномене Артюса отмечается повышение уровня IgG и снижение уровня IgE, более выраженное в крови, чем в лимфе. Концентрация гистамина повышается, как при анафилактическом шоке, так и при феномене Артюса, но более выражено при анафилаксии. Повышение концентрации гистамина в крови больше, чем в лимфе.

Ключевые слова: анафилактический шок; феномен Артюса; гистамин; иммуноглобулины

Alieva T.R., Allahverdieva L.I.

The comparative characteristic of level of histamine, IgE and IgG in blood and the lymph at the experimental anaphylactic shock and Artyus phenomenon

Azerbaijan Medical University, st. Bakikhanova, 23, Baku

Maintenance changes of histamine and levels of immunoglobulin E and G in blood and lymph are studied at the experimental anaphylactic and Artyus phenomenon. Experiments were conducted in two series on 27 rabbits of "Chinchilla" breed. As control are served the investigated indicators of concentration of histamine and levels of IgE and IgG in blood and lymph of intact animals. Results of research have shown that, at the experimental anaphylactic shock increase the level of IgE and decrease the level of IgG. At the Artyus phenomenon increase of level of IgG and the decrease in level of IgE more expressed in blood, than in lymph is marked. Concentration of histamine raises, both at the anaphylactic shock, and at the of Artyus phenomenon, but is more expressed at anaphylaxis, and also in blood, than in lymph.

Key words: anaphylactic shock; Artyus phenomenon; histamine; immunoglobulin

К настоящему времени патогенетическая роль иммуноглобулинов класса E (IgE) при аллергических заболеваниях человека изучена достаточно хорошо и подтверждением тому служит значительное число научных исследований [1—4]. Иммуноглобулин E — ключевая молекула, определяющая особенности формирования и проявления классических аллергических состояний. Иммуноглобулин E через высокоаффинные FcεRI-рецепторы участвует в высвобождении из активированных тучных клеток и базофилов целого ряда медиаторов аллергического воспаления (гистамин, гепарин, триптаза и т.д.) [3]. Тучные клетки широко представлены в дыхательных путях, включая альвеолы легких, желудочно-кишечном тракте, коже. В организме реагирует лишь

небольшая часть сенсibilизированных IgE тучных клеток, остальные клетки ингибируются при посредстве выделившихся аллергических медиаторов, способных тормозить свое дальнейшее высвобождение.

Высвобождение медиаторов аллергического воспаления из тучных клеток тканей и базофилов крови является основной причиной развития патофизиологических проявлений аллергических реакций. Среди них важная роль принадлежит гистамину, осуществляющему свои эффекты через соответствующие рецепторы различных типов. Активация гистамина через H1-H4 рецепторы ведет к коронарной вазоконстрикции и сердечной недостаточности (H1-рецепторы), системной вазодилатации и тахикардии (H2-рецепторы), торможению высвобождения норадреналина (H3-рецепторы), хемотаксису и высвобождению медиаторов воспаления (H4-рецепторы) [4].

Гистамин является не только медиатором ранней фазы воспаления, но и возможным важнейшим фактором, участвующим в регуляции синтеза IgE, гиперпродукция которого лежит в основе atopических заболеваний. Известно, что через H1-рецепторы осуществляется положительная, а через H2-рецепторы — негативная регуляция синтеза IgE. В последнее время стало известно, что в регуляции синтеза IgE принимают участие также H3 и H4-рецепторы активирующие лимфоциты, эозинофилы и тучные клетки [5, 6]. Наличие рецепторов для гистамина на различных клетках, участвующих в иммунном ответе, и широкий спектр эффектов, опосредуемых этим медиатором, — факты, которые дали полное основание рассматривать гистамин как мощный эндогенный иммуномодулятор [5].

Ключевую роль в механизмах иммунологического распознавания чужеродных антигенов играют специфические антитела подклассов IgG, которые в процессе иммунного ответа подключают каскад клеточно-опосредованных механизмов естественной защиты организма.

Учитывая важную роль гистамина и иммуноглобулинов в патогенезе аллергических реакций, целью исследования явилось сравнительное определение уровней гистамина, IgE и IgG в крови и лимфе при экспериментальном анафилактическом шоке и феномене Артюса.

Методика

Эксперименты проведены на 27 кроликах породы «Шиншилла» (масса 2,5—3 кг) в двух сериях. В первой серии (9 голов) эти показатели определены у кроликов на модели анафилактического шока, во второй (9 голов) — на модели феномена Артюса. Контролем служили исследуемые показатели гистамина, IgE и IgG в крови и лимфе интактных кроликов (9 голов). Для воспроизведения анафилактического шока кроликов сенсibilизировали путем подкожного введения 0,1 мл лошадиной сыворотки, а разрешающую дозу (1 мл) вводили в полость сердца. Для воспроизведения феномена Артюса кроликов сенсibilизировали путем подкожного введения 1 мл лошадиной сыворотки в лопаточную область кролика через каждые 5 сут. в течение 25 сут. После пятой инъекции в области введения лошадиной сыворотки наблюдался некроз.

Необходимую для опыта кровь брали из краевой вены уха кроликов, лимфу — из грудного лимфатического протока по методу А.А.Корниенко в модификации М.Х. Алиева и В.М. Мамедова [6].

Уровень гистамина определяли флюорометрическим методом, который основан на получении флуорофора

с 0,1% ортофталевым альдегидом на аппарате «Биан-130».

Определение уровней IgE и IgG в крови и лимфе животных проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (тИФА) на соответствующих тест-системах («Farming», США). Результаты исследования оценивались на полуавтоматическом анализаторе Stat-Fax-2000 (США).

При статистической обработке полученных данных применены методы описательной статистики, ранговый критерий Уилкоксона—Манна—Уитни. Среднее значение полученных выборок применено в формате $M \pm m$ (min-max).

Результаты и обсуждение

Результаты проведенных исследований показали, что уровень гистамина увеличивался как при анафилактическом шоке, так и при феномене Артюса, однако при анафилактическом шоке более значимо (таблица).

Так, на стадии сенсibilизации анафилактического шока (7-е сут.) уровень гистамина в крови повышался в 1,6 раза по сравнению с интактными животными и составил $0,79 \pm 0,04$ мМ/л. На стадии анафилактического шока (21-е сут.) отмечалось значительное повышение уровня гистамина в крови — в 3,8 раза по сравнению с интактными животными ($1,89 \pm 0,06$ мМ/л против $0,49 \pm 0,04$ мМ/л, $p < 0,001$). Через 30 мин после шока уровень гистамина в крови снизился в 2,7 раза в сравнении с периодом шока.

После воспроизведенного анафилактического шока три животных погибло, в связи с чем кровь была взята только у 6 животных после 30 мин экспозиции анафилактического шока.

В лимфе эти показатели в сравнении с кровью были ниже. Так, если на 7-е сут. сенсibilизации уровень гистамина в лимфе по сравнению с показателями у интактных животных увеличился в 1,4 раза ($p < 0,001$), то в периоде шока (на 21-е сут.) — в 3,3 раза и составил $2,12 \pm 0,04$ мМ/л ($p < 0,001$). Через 30 мин после шока уровень гистамина снизился до 1,1 мМ/л, что было в 1,7 раза выше показателей, определяемых у интактных животных.

Уровни иммуноглобулинов изменялись по-разному. Так, если на стадии сенсibilизации анафилактического шока (7-е сут.) уровень IgE в крови повышался по сравнению с показателями у интактных животных в 3,5 раза и был равен $35,61 \pm 0,86$ МЕ/л, то уровень IgG в этом периоде повышался лишь в 1,5 раза. На стадии анафилактического шока (21-е сут.) уровень IgE повышался в 14,7 раза по сравнению с показателями у интактных животных и соста-

вил $151,17 \pm 1,08$ МЕ/л, тогда как уровень IgG в периферической крови по сравнению с показателями у сенсibilизированных животных снижался до $6,00 \pm 0,17$ г/л.

В периоде сенсibilизации уровень IgE в лимфе повышался в 3,4 раза по сравнению с показателями у интактных животных и составил $15,31 \pm 0,61$ МЕ/л. В этом же периоде уровень IgG был в 2 раза меньше и составил $7,65 \pm 0,38$ г/л. В периоде анафилактического шока уровень IgE в лимфе повышался в 11,2 раза и составил $50,17 \pm 0,8$ МЕ/л, тогда как уровень IgG, напротив, снижался в 1,4 раза и составил $4,03 \pm 0,13$ г/л ($p < 0,001$).

При феномене Артюса, относящемся к иммунокомплексным реакциям, уровень иммуноглобулинов изменялся следующим образом. Уровень IgG в крови и лимфе животных повышался, тогда как уровень IgE, напротив, снижался. Так, в периоде сенсibilизации феномена Артюса (5-е сут.) уровень IgE в крови повышался в 1,65 раза, а уровень IgG — в 1,8 раза по сравнению с интактными животными

($p < 0,001$). В периоде феномена Артюса уровень IgE в крови повышался в 1,6 раза по сравнению с интактными животными и был равен $16,56 \pm 0,63$ МЕ/л ($p < 0,001$). Уровень IgG повышался в 4,3 раза и составил $23,13 \pm 0,72$ г/л ($p < 0,001$).

На 5-е сут. сенсibilизации феномена Артюса уровни IgE и IgG в лимфе повышались по сравнению с показателями у интактных животных соответственно в 2,6 и 2,1 раза ($p < 0,001$), а уровень гистамина — в 1,1 раза ($p < 0,05$). На 25-е сут. сенсibilизации уровень IgE в лимфе составил $8,32 \pm 0,33$ МЕ/л, IgG — $15,07 \pm 1,04$ г/л, а содержание гистамина составило $1,70 \pm 0,02$ мМ/л ($p < 0,001$). Уровень IgE был умеренно повышенным, как в периоде сенсibilизации, так и в периоде феномена Артюса, но менее выражено в сравнении с концентрацией IgG. В периоде феномена Артюса отмечалось значительное повышение уровня IgG, более выраженное в крови, чем в лимфе. Концентрация гистамина повышалась в периоде феномена Артюса больше в крови, чем в лимфе.

Таблица

Уровни иммуноглобулинов E и G и гистамина в крови и лимфе при анафилактическом шоке и феномене Артюса (M \pm m) (max-min), n = 27

Показатели	Анафилактический шок (n = 9)			
	В крови		В лимфе	
	7-е сут. сенсibilизации	21-е сут. сенсibilизации	7-е сут. сенсibilизации	21-е сут. сенсibilизации
IgE, МЕ/л	$35,61 \pm 0,85^*$ (32,0–39,0)	$151,17 \pm 1,08^*$ (148,0–155,0)	$15,31 \pm 0,61^*$ (13,0–17,0)	$50,17 \pm 0,8^*$ (48,0–53,0)
IgG, г/л	$8,06 \pm 0,39^*$ (6,0–10,0)	$6,00 \pm 0,17^*$ (5,2–6,8)	$7,65 \pm 0,38^*$ (6,3–9,0)	$4,03 \pm 0,13^*$ (3,2–5,0)
Гистамин, мМ/л	$0,79 \pm 0,04^*$ (0,65–0,95)	$1,89 \pm 0,06^*$ (1,65–2,2)	$0,90 \pm 0,02^*$ (0,8–0,99)	$2,12 \pm 0,04^*$ (1,98–2,3)
Показатели	Феномен Артюса (n = 9)			
	В крови		В лимфе	
	5-е сут. сенсibilизации	25-е сут. сенсibilизации	5-е сут. сенсibilизации	25-е сут. сенсibilизации
IgE, МЕ/л	$17,1 \pm 1,12^*$ (12,0–22,0)	$16,56 \pm 0,63^*$ (14,0–20,0)	$12,05 \pm 0,38^*$ (10,2–13,5)	$8,32 \pm 0,33^*$ (7,0–9,0)
IgG, г/л	$9,46 \pm 0,24^*$ (8,5–10,5)	$23,13 \pm 0,72^*$ (20,0–26,0)	$6,14 \pm 0,35^*$ (3,0–5,7)	$15,07 \pm 1,04^*$ (10,0–16,8)
Гистамин, мМ/л	$0,65 \pm 0,04^{\wedge}$ (0,49–0,8)	$1,75 \pm 0,05^*$ (1,5–1,95)	$0,72 \pm 0,02^{\wedge}$ (0,65–0,79)	$1,70 \pm 0,02^*$ (1,65–1,81)
Показатели	Интakтные животные (n = 9)			
	В крови		В лимфе	
IgE, МЕ/л	$10,26 \pm 0,40$ (8,0–12,0)		$4,48 \pm 0,35$ (3,0–6,0)	
IgG, г/л	$5,39 \pm 0,53$ (3,0–8,0)		$2,92 \pm 0,13$ (2,3–3,5)	
Гистамин, мМ/л	$0,49 \pm 0,04$ (0,3–0,65)		$0,65 \pm 0,02$ (0,56–0,79)	

Примечание. Достоверный интервал по сравнению с интактной группой животных при: * $p < 0,001$; $\wedge p < 0,05$

В периоде сенсибилизации феномена Артюса на месте инъекции отмечались сначала гиперемия, а затем инфильтративное воспаление. На 20—25 сутки сенсибилизации (период феномена Артюса) в месте инъекции наблюдалась окруженная некрозом гиперемия ткани. У некоторых животных некроз занимал большую часть участка, у других наблюдалась только гиперемия.

В условиях *in vitro* показана возможность высвобождения медиаторов аллергии из клеток-мишеней, вызванного анти-IgG антителами или IgG-аллоантителами. Высвобождение медиаторов в этих случаях опосредовано рецепторами к Fc-фрагменту IgG и относится к неспецифическим цитотоксичным энергозависимым процессам [7].

Известно, что при взаимодействии с аллергеном могут образовываться иммунные комплексы, содержащие реагены (IgE и IgG) или блокирующие IgG-антитела. Показано, что агрегированный IgG, сам по себе не вызывавший высвобождения гистамина из тучных клеток крыс, обладал способностью модулировать секрецию гистамина, вызванную специфическим антигеном анти-IgG сывороткой. Результаты исследований показали, что как агрегированный, так и дезагрегированный IgG человека не вызывали высвобождения гистамина из базофилов здоровых лиц в концентрации 3—333 мкг/мл [(2.8) 2,8].

Полученные данные позволяют предположить, что в условиях *in vivo* иммунные комплексы, содержащие агрегированный антигеном IgG, могут, как высвобождать медиаторы аллергии из базофилов, так и модулировать опосредованное IgE высвобождение гистамина из клеток-мишеней аллергии [9, 10]. В наших экспериментах гистамин высвобождался в ответ на введенную в организм лошадиную сыворотку и зависел не от дозы, а от пути введения антигена.

Выводы

1. При экспериментальном анафилактическом шоке наблюдается повышение уровня IgE и снижение уровня IgG. Данное повышение уровня IgE более выражено в крови, чем в лимфе, что связано с выделением IgE непосредственно в кровь.

2. При феномене Артюса, относящемся к иммунокомплексным реакциям, отмечается повышение уровня IgG и снижение уровня IgE, более выраженное в крови, чем в лимфе.

3. Концентрация гистамина повышается, как при анафилактическом шоке, так и при феномене Артюса, но более выражено при анафилаксии, и более выражено в крови, чем в лимфе.

4. Применение антигистаминных препаратов эффективнее при атопических реакциях, чем при иммунокомплексных, в случае которых секреция гистамина менее выражена.

Список литературы

1. Алиев С.Д. Роль некоторых микроэлементов в процессе высвобождения гистамина из тучных клеток крыс. *Интернациональный журнал по иммунореабилитации*. 1998; 8: 609.

2. Гушин И.С., Зебрев А.И., Алешкин В.А., Порошина Ю.А. Опосредованное IgG высвобождение гистамина из базофилов человека. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 1983; 4: 18-21.

3. Корниенко А.А., Куликовский Н.Н., Сорокатый А.Е. Катетеризация грудного протока в эксперименте. *Актуальные вопросы топографической анатомии и оперативной хирургии*. М., 1977; 1: 22-6.

4. Прозоровский Н.С., Порошина Ю.А. Опосредованная активацией тучных клеток индукция *in vivo* гистамин высвобождающей активности мононуклеарных клеток периферической крови при атопии. *Иммунология*. 2002; 2: 63-5

5. Алиев С.Д., Тагдиси Д.Г., Исмаилов Т.А. О роли микроэлементов в иммунных механизмах анафилактических реакций. *Материалы III национальной конференции по иммунологическим, иммунопатологическим и аллергическим проблемам*. Баку, 2004: 167.

6. Алиева Т.Р. Определение уровня серотонина и иммуноглобулинов E, G в крови и лимфе при экспериментальных анафилактическом шоке и феномене Артюса. *Международный медицинский журнал*. 2010; 11(2):72-5.

7. Просекова Е.В., Деркач В.В., Шестовская Т.Н. и др. Цитокиновый профиль и динамика синтеза IgE при аллергических заболеваниях у детей. *Иммунология*. 2010; 3: 140-3.

8. Ishizaka K. Antibodies: Prot. Destr. and Regul. Role. *9th Int. Conv. Immunol. Amnerst*. N.Y., June 25-28, 1984, Basel, 1985, p. 266-74.

9. Свищевская Е.В., Алексеева Л.Г., Марченко А.М. и др. Снижение продукции IgE рекомбинантными пептидами из основных белков аллергенов. *Иммунология*. 2006; 2: 91-7.

10. Свищевская Е.В., Шевченко М.А., Алексеева Л.Г., Матушевская Е.В. и др. Продукция IgG и цитокинов у больных атопическим дерматитом. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2005; 1: 40-5.

Поступила 23.01.15

References

1. Aliev S.D., Role of some microelements in the process of production of histamine by mast cells of rats. *International journal of immunorehabilitation*, 1998; 8: 609. (in Russian)

2. Gushchin I.S., Zebrev A.I., Aleshkin V. A, Poroshina Y.A. The mediated IgG liberation of histamine from the human basophiles. *Pathological physiology and experimental therapy*. 1983; 4: 18-21. (in Russian)

3. Kornienko A.A., Kulikovskiy N.N., Sorokatiy A.E. Catheterization of thoracic duct in experiment. Actual questions of topographical anatomy and operative surgery, M, 1977, №1: 22-6. (in Russian)

4. Prozorovskiy N.S., Poroshina y.A. The mediated activation of mast cells induction *in vivo* histamine liberating activity of mononuclear cells of peripheral blood at the atopy. *Immunology*. 2002; 2:63-5.

5. Aliev S.C., Tagdisi D.G., Ismailov T.A. About a role of microelements in the immune mechanisms of the anaphylactic reactions. *Materials of III national conference on immunological immunopathological and to allergic problems*. Baku, 2004: 167. (in Russian)

6. Alieva T.R. Definition of level of serotonin, IgE and IgG in blood and a lymph at the experimental anaphylactic shock and Artyus phenomenon. *The International Journal of medicine*. 2010; 11(2): 72-5. (in Russian)

7. Prosekova E.V., Derkach V.V., Shestovsky T.N. et al. The cytokine profile and dynamics of synthesis of IgE at the allergic diseases at children. *Immunology*. 2010; 3: 140-43. (in Russian)

8. Ishizaka K. Antibodies: Prot. Destr. and Regul. Role. *9th Int. Conv. Immunol. Amnerst*, N.Y., June 25-28, 1984, Basel, 1985, p. 266-74.

9. Svirshchevskaya E.V., Alekseeva L.G., Marchenko A.M., et al. Decrease in production of IgE with recombinant peptides from the basic proteins of allergens. *Immunology*. 2006; 2: 91-7. (in Russian)

10. Svirshchevskaya E.V., Shevchenko of M.A, Alekseeva L.G., Matushevskaja E.V., et al. Production of IgG and cytokines at patients with atopic dermatitis. *Bulletin of dermatology and venereology*. 2005; 1: 40-5. (in Russian)

Received 23.01.15

Сведения об авторах:

Аллахвердиева Л.И., доктор мед. наук, проф., курс клинической аллергологии и иммунологии, e-mail: allah-verdiyeva-lala@rambler.ru

Отман И.Н., Зозуля С.А., Сарманова З.В., Ключник Т.П.

Воспалительные и аутоиммунные реакции при различных формах нарушения функционирования нервной системы

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр психического здоровья»,
115522, Москва, Каширское шоссе, д. 34

Проведен сравнительный анализ воспалительных факторов (по активности лейкоцитарной эластазы и $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора), а также аутоиммунных реакций (по уровню аутоантител к фактору роста нервов и основному белку миелина) в сыворотке крови 107 детей с последствиями перинатальных поражений ЦНС, 188 детей с расстройствами аутистического спектра и 108 подростков с шизофренией в динамике. Исследованы клиничко-иммунологические взаимосвязи между этими показателями и клинической оценкой состояния больных по соответствующим психометрическим шкалам. Подтверждена вовлеченность врождённого иммунитета в патогенез всех изученных форм нарушения функционирования нервной системы. Активация приобретённого иммунитета (аутоиммунные реакции) выявлена только у пациентов с наиболее тяжёлыми формами нарушений. Выявлена взаимосвязь между активностью/уровнем иммунологических показателей и остротой и тяжестью патологического процесса в нервной системе во всех обследованных группах. Таким образом, воспалительные и аутоиммунные реакции являются общим патогенетическим механизмом всех изученных форм нарушения функционирования нервной системы.

Ключевые слова: воспалительные факторы; аутоиммунные реакции; последствия перинатальных поражений ЦНС; расстройства аутистического спектра; подростковая шизофрения

Otman I.N., Zozulya S.A., Sarmanova Z.V., Klushnik T.P.

Inflammatory and autoimmune reactions in different forms of nervous system functioning disorders

Federal State Budgetary Scientific Institution «Mental Health Research Centre», 34, Kashirskoye sh., Moscow, 115522, Russia

Parameters of innate (the leukocyte elastase (LE) and $\alpha 1$ -proteinase inhibitor ($\alpha 1$ -PI) activity) and adaptive immunity (the level of autoantibodies to neuroantigens nerve growth factor (NGF) and myelin basic protein (MPB)) were studied over time in the blood serum of 107 children with perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy; 188 children with autism spectrum disorder; 108 patients with schizophrenia. The correlations between immunological parameters and clinical status assessment in all groups of patients using psychometric scales were analyzed. The involvement of innate immunity, i.e. inflammatory reactions, in pathogenesis of all analyzed forms of nervous system functioning disorders was confirmed. The activation of adaptive immunity, i.e. autoimmune reactions, was found only in the group of patients with the most severe forms of nervous system functioning endogenous disorders. The results indicate that the inflammatory and autoimmune reactions are pathogenic mechanism of all studied forms of nervous system functioning disorders.

Key words: inflammatory and autoimmune reactions; perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy; autism spectrum disorder; schizophrenia

Нарушения функционирования нервной системы (НФНС) могут возникать под влиянием как экзогенных (гипоксические, инфекционные, травматические, токсические, психогенные), так и эндогенных (генетические) факторов, а также при их сочетании и взаимодействии. Трудности клинической диагностики этих состояний в детском и подростковом возрасте могут быть связаны с неспецифической клинической картиной болезни ввиду незрелости нервной системы.

Исследование патогенетической роли иммунных факторов при нервно-психической патологии является актуальным направлением современной нейробиологии [1—3]. Первые исследования в этом направлении, начатые в 60-е годы XX века, связаны с появлением аутоиммунной гипотезы, в основе которой лежат данные, свидетельствующих о наличии в крови больных с аутизмом и шизофренией, повышенных уровней аутоантител (ААТ) к антигенам мозга. Известно, что в норме ААТ являются регуляторами многих физиологических процессов в организме, а их повышение рассматривается в качестве неблагоприят-

Для корреспонденции: Отман Ирина Николаевна, науч. сотр. лаб. нейробиологии, e-mail: irinaot@mail.ru

ного фактора, свидетельствующего о развитии патологического процесса [4, 5].

В последнее десятилетие наблюдается повышенный интерес к изучению роли воспалительных реакций в развитии нервно-психических заболеваний. Признаки воспалительных реакций выявляют как в мозге, так и в крови таких больных. В мозге эти изменения затрагивают морфологию и функциональную активность глиальных клеток, вспомогательных клеток, окружающих нейроны и выполняющих опорную, трофическую и защитную функции по отношению к ним [6, 7]. В крови и ликворе пациентов признаки воспаления проявляются в виде нарушения цитокинового баланса в сторону увеличения содержания провоспалительных факторов (IL-1, -6, -8, IFN- α и - β) [8—10], повышения активности металлопротеиназ, активно участвующих в деструкции тканей при развитии воспалительного процесса [11], селектинов, молекул адгезии, белков острой фазы воспаления (С-реактивный белок) др. [12]. Выявлены признаки морфологических, количественных и функциональных изменений ряда иммунных клеток: Т- и В-лимфоцитов [13], НК клеток, моноцитов [14, 15].

Среди различных иммунологических показателей, детектируемых в крови больных с нервно-психическими заболеваниями, наибольший интерес представляют те из них, которые взаимосвязаны с особенностями клинического состояния пациентов. По результатам наших исследований, проведённых в лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ НЦПЗ [16, 11], к таким показателям относятся факторы врождённого иммунитета — активность лейкоцитарной эластазы (ЛЭ) и $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора ($\alpha 1$ -ПИ).

ЛЭ — сериновая протеаза, выделяющаяся во внеклеточное пространство из азурофильных гранул нейтрофилов при дегрануляции. ЛЭ разрушает коллаген I, II, III, IV типов, эластин, факторы коагуляции — фибриноген и фибрин, а также базальную мембрану эндотелия сосудов. В некоторых случаях ЛЭ рассматривается в качестве фактора, вовлечённого в нарушение проницаемости ГЭБ [17, 18].

$\alpha 1$ -ПИ — белок острой фазы воспаления, уровень которого повышается в сыворотке одним из первых при развитии воспалительных реакций. $\alpha 1$ -ПИ ограничивает протеолитическую активность ЛЭ, выполняя важную функцию в регуляции воспалительных реакций [19].

Другими иммунологическими показателями, взаимосвязанными с особенностями клинического состояния больных, являются уровни ААТ к нейроантигенам [16, 20]. Повышенный синтез ААТ к нейроантигенам является специфической реакцией приобретённого иммунитета на патологический процесс

в нервной ткани, в том числе обусловленный нарушением проницаемости ГЭБ.

В настоящей работе проведён сравнительный анализ показателей врождённого и приобретённого иммунитета при различных формах НФНС в динамике заболевания в ходе проводимой терапии, что представляет значительный интерес для диагностики, терапии и прогноза дальнейшего развития этих состояний. Исследованы НФНС как экзогенной (дети с последствиями ПП ЦНС), так и эндогенной природы (дети с РАС и подростки с шизофренией).

Методика

Исследование выполнено на клинической базе отделений восстановительного лечения ФГБНУ Научного центра здоровья детей и следующих подразделений ФГБНУ НЦПЗ: отдел по изучению проблем детской психиатрии с группой исследования детского аутизма, отдел по изучению проблем подростковой психиатрии на базе подростковых отделений Московской городской клинической психиатрической больницы № 15 и отдел по изучению эндогенных психических расстройств и аффективных состояний с группой по изучению психических расстройств юношеского возраста.

Иммунологическое исследование проведено в лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ НЦПЗ.

Было обследовано 3 группы пациентов.

1-я группа — 107 детей с последствиями ПП ЦНС гипоксически-ишемического генеза (G93.4, G24.8 по МКБ-10) в возрасте от 1 до 12 мес. (средний возраст $9,6 \pm 5,7$ мес.). Дети были разделены на две подгруппы в зависимости от гестационного возраста при рождении: 1-я подгруппа — доношенные дети ($n = 80$, средний возраст $5,6 \pm 3$ мес.) и 2-я подгруппа — недоношенные дети 34—36 нед. гестации ($n = 27$, средний возраст $6,7 \pm 2,5$ мес.).

Оценка психомоторного развития (ПМР) детей проводилась с использованием психолого-неврологического теста «Гном» [21].

Клиническое и иммунологическое обследование (оценка ПМР и определение показателей врождённого и приобретённого иммунитета) проводили в динамике: до лечения и повторно — через 6—12 мес. после лечения. Проводимая терапия включала препараты ноотропного ряда, витамины группы В, вазоактивные, метаболические, противосудорожные, гиполикворные, антиспастические и седативные препараты.

Критерием включения в исследование служило наличие у детей задержки психомоторного развития (ЗПМР) вследствие ПП ЦНС гипоксически-ишемического генеза; критерием исключения — ЗПМР,

обусловленная наследственной патологией или врождёнными пороками развития ЦНС.

2 группа — 188 детей с психотическими формами РАС (средний возраст $9 \pm 2,3$ года). Все дети также были разделены на две подгруппы:

- 1-я подгруппа — 129 пациентов с детским психозом (ДП — F84.02 по МКБ-10);
- 2-я подгруппа — 59 пациентов с атипичным детским психозом (АДП — F84.11).

Клинико-психопатологическая оценка больных с РАС проводилась с использованием шкалы психологообразовательного профиля РЕР [22] (суммарный балл по когнитивным и аутистическим подшкалам) и шкалы количественной оценки выраженности детского аутизма CARS [23].

Критерием включения служило наличие у детей манифестного острого развернутого психотического приступа — детского психоза (F84.02) или эндогенного атипичного детского психоза (F84.11).

Критерием исключения являлись непсихотические формы РАС (синдром Аспергера, синдром Каннера, атипичный аутизм при генетических синдромах Мартина—Белл, Ретта, Дауна, Ангельмана) или другие психотические формы РАС при установленных формах генетической патологии с умственной отсталостью.

3-я группа — 108 пациентов подросткового возраста с диагнозом шизофрении (средний возраст $17,8 \pm 1,8$ года), разделённых на две подгруппы:

- 1-я подгруппа — пациенты с малопрогредиентной шизофренией (МШ) с непрерывным течением (шизотипическое расстройство — F21.4, F21.3) — 30 чел.;
- 2-я подгруппа — пациенты с приступообразно-прогредиентной шизофренией (ППШ) (параноидная шизофрения — F20.01, F20.02) — 78 чел.

Для клинической оценки пациентов с шизофренией использовали шкалу оценки позитивных и негативных синдромов PANSS [24].

Критерием включения больных в исследование было наличие выраженного обострения шизофренического процесса.

Клинико-иммунологическое обследование пациентов с РАС и шизофренией также проводили в динамике: до лечения (при поступлении в стационар в стадии обострения) и повторно (через 1—3 мес. после проведенной терапии в стадии терапевтической ремиссии). Традиционная терапия включала в себя типичные (галоперидол, аминазин, клопиксол, хлорпротиксен) и атипичные (азалептин, рисполепт, зипрекс) нейролептики, антидепрессанты (амитриптилин, анафранил), ингибиторы обратного захвата серотонина (золот).

Соответствующие контрольные группы были сформированы из соматически и психически здоро-

вых детей и подростков, сопоставимых по возрасту и полу с пациентами обследованных групп:

- 30 детей первого года жизни (средний возраст $6,2 \pm 2,5$ мес.);
- 26 детей (средний возраст $7 \pm 2,8$ года);
- 30 подростков (средний возраст $16 \pm 1,5$ года).

Критерием исключения для контрольных групп служило наличие неврологической или психической патологии.

Критериями исключения для всех групп пациентов и групп контроля было наличие аутоиммунных и острых инфекционно-воспалительных заболеваний в течение 2 месяцев, предшествующих обследованию.

Энзиматическую активность ЛЭ определяли спектрофотометрическим методом по скорости расщепления специфического хромогенного субстрата N- α -трет-Вос-L-аланин-п-нитрофенилового эфира и оценивали в нмоль/мин \times мл [25, 26].

Функциональную активность α 1-ПИ в сыворотке крови оценивали с помощью унифицированного энзиматического метода [27] по степени ингибирования трипсина с использованием в качестве субстрата N- α -бензоил-L-аргинин этиловый эфир гидрохлорида, а оценивали в ингибиторных единицах на 1 мл (ИЕ/мл).

Уровень ААТ к нейроантигенам: фактору роста нервов (ФРН) и основному белку миелина (ОБМ) в сыворотке крови определяли методом твёрдофазного иммуноферментного анализа и оценивали в единицах оптической плотности [16].

Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием компьютерной программы Statistica-7 (для Windows, StatSoft., Inc., USA). Для статистического анализа были выбраны следующие непараметрические методы: U-критерий Манна—Уитни; T-критерий Вилкоксона; коэффициент ранговой корреляции Спирмана (r); медиана; интерквартильный размах (25-й; 75-й процентиль) и Chi-square (χ^2).

Результаты и обсуждение

На рис. 1—3 приведена динамика определения изучаемых иммунологических показателей при всех изученных формах НФНС. Полученные результаты представлены в процентах по отношению к контролю.

Как показано на рис. 1—3, до начала лечения выявлена активация врожденного иммунитета (по активности ЛЭ и α 1-ПИ) по сравнению с контролем в сыворотке крови пациентов всех обследованных групп: детей с последствиями ПП ЦНС, детей с РАС, а также подростков с шизофренией ($p < 0,01$ для всех групп). При этом достоверных отличий по

активности изучаемых показателей между группами не обнаружено.

В каждой нозологической группе выявлены клинико-биологические корреляции между активностью ЛЭ и степенью остроты патологического процесса, выраженной в баллах по соответствующим психометрическим шкалам.

Выявлены отрицательные корреляции между активностью ЛЭ и общим баллом по тесту «Гном» у детей с последствиями ПП ЦНС ($r = 0,56$, $p = 0,03$); между активностью ЛЭ и баллом по субшкале «взаимоотношения» шкалы психолого-образовательного профиля РЕР у детей с РАС ($r = 0,27$, $p < 0,03$), а также положительная корреляция между

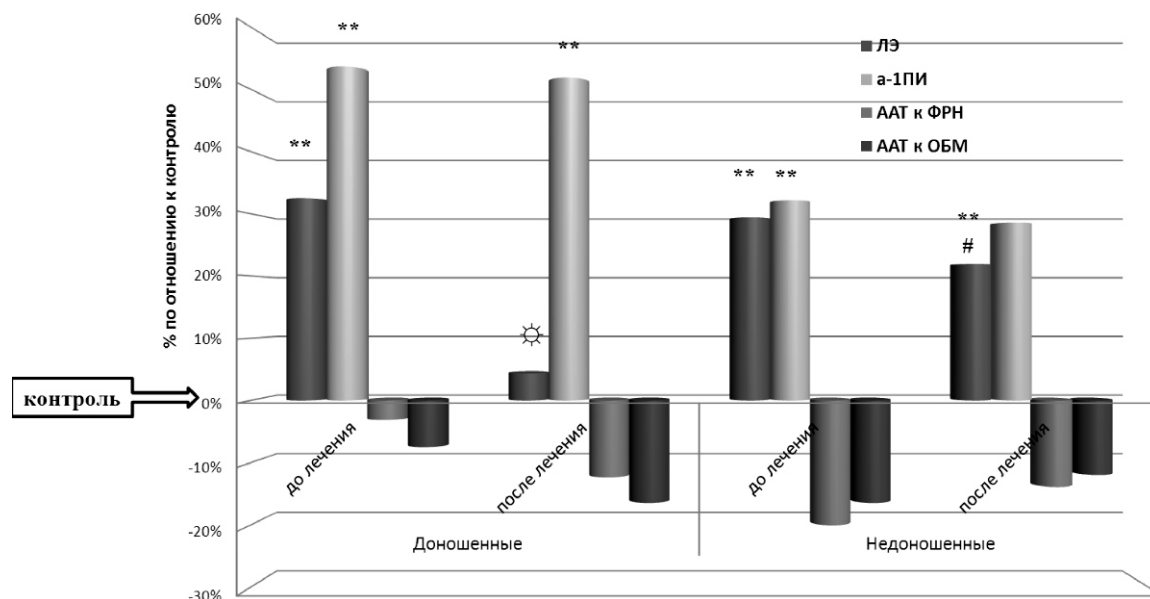


Рис. 1. Активность/уровень иммунологических показателей (ЛЭ, α-1ПИ и ААТ к фактору роста нервов, основному белку миелина) в сыворотке крови детей с последствиями ПП ЦНС:

** – достоверные отличия от контрольной группы, $p < 0,01$; # – достоверные различия между группами, $p < 0,05$; 0 – достоверные различия между обследованием до лечения и после лечения, $p < 0,01$.

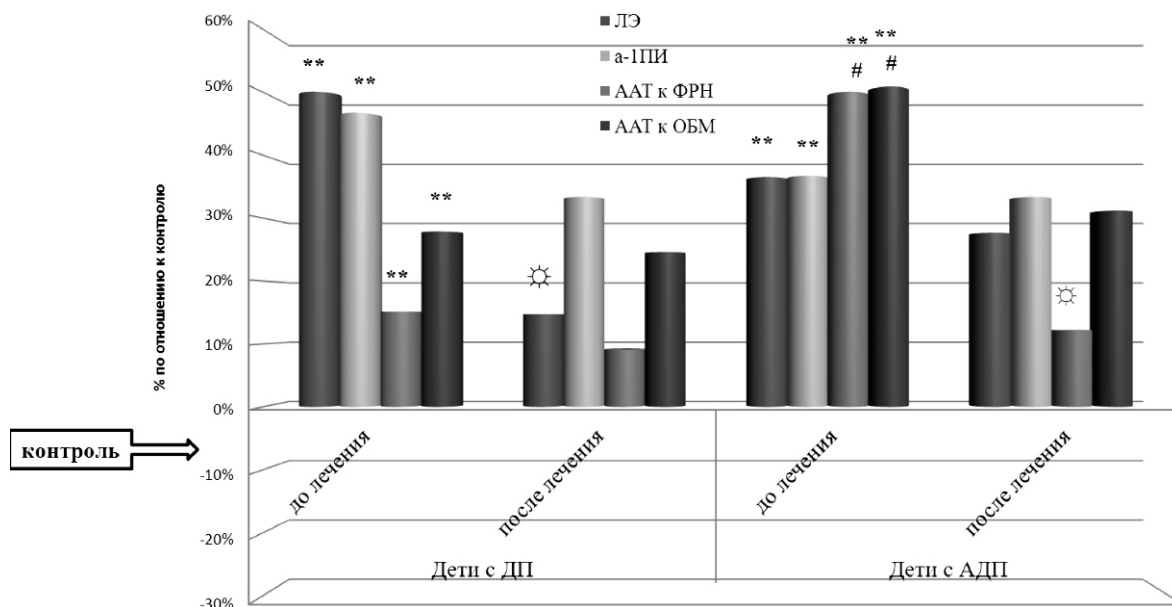


Рис. 2. Активность/уровень иммунологических показателей (ЛЭ, α-1ПИ и ААТ к фактору роста нервов, основному белку миелина) в сыворотке крови детей с РАС:

** – достоверные отличия от контрольной группы, $p < 0,01$; # – достоверные различия между группами, $p < 0,05$; 0 – достоверные различия между обследованием до лечения и после лечения, $p < 0,05$.

активностью ЛЭ и суммарным баллом по шкале PANSS при шизофрении ($r = 0,53, p < 0,05$).

Таким образом, активность ЛЭ взаимосвязана с острой патологическим процессом при последствиях ПП ЦНС, РАС и шизофрении.

Корреляционный анализ между клинической оценкой по тесту «Гном» в общей группе детей с ПП ЦНС и активностью α -1ПИ выявил прямую взаимосвязь между этими показателями ($r = 0,31, p < 0,01$). Выявлена положительная корреляция между активностью α 1-ПИ и выраженностью клинической симптоматики по шкале позитивных синдромов (PANSS) у подростков с шизофренией ($r = 0,65, p < 0,05$), т.е. чем выше активность α 1-ПИ, тем тяжелее состояние пациента.

Таким образом, выявленная активация врожденного иммунитета (оцененная по активности ЛЭ и функциональной активности α 1-ПИ) наблюдается при всех изученных формах НФНС (как экзогенных, так и эндогенных) и, следовательно, является неспецифической реакцией иммунной системы на патологический процесс в нервной системе.

С одной стороны, повышение активности ЛЭ можно рассматривать как естественный ответ нормальной иммунной системы на повреждение. С другой стороны, развитие воспалительного процесса и нарастание активности ЛЭ может способствовать повреждению эндотелиальных клеток, ослаблению межэндотелиальных связей, расщеплению поверхностных белков и нарушению целостности сосудов ГЭБ, что мо-

жет привести к выходу в кровотоки нейроантигенов с последующим синтезом ААТ, т.е. активации приобретенного иммунитета.

По данным литературы, аутоиммунный компонент к нейроантигенам сопровождается различными неврологическими и психическими заболеваниями, в том числе гипоксически-ишемическими поражениями ЦНС, биполярными и аффективными психозами, шизофренией и др., однако взаимосвязь между уровнем ААТ и особенностями клинического состояния пациентов тщательно не исследовалась.

В настоящей работе показано, что до лечения достоверно высокий уровень ААТ по сравнению с контролем наблюдается в крови пациентов с наиболее тяжелыми эндогенными формами НФНС: в общей группе детей с РАС ($p < 0,05$ у детей с ДП и $p < 0,001$ у детей с АДП) и подростков с ППШ ($p < 0,01$). В общей группе детей с последствиями ПП ЦНС, а также в подгруппе больных с МШ (относительно благоприятной по исходу форме подростковой шизофрении), достоверного повышения уровня ААТ не наблюдалось.

Можно предположить, что появление высоких титров ААТ к ФРН у больных с ДП, АДП и ППШ в стадии обострения обусловлено большей степенью выраженности деструктивного процесса в нервной системе, а также повышением проницаемости ГЭБ, что имеет место при шизофрении [11, 15]. Циркулирующие в крови ААТ могут проникать

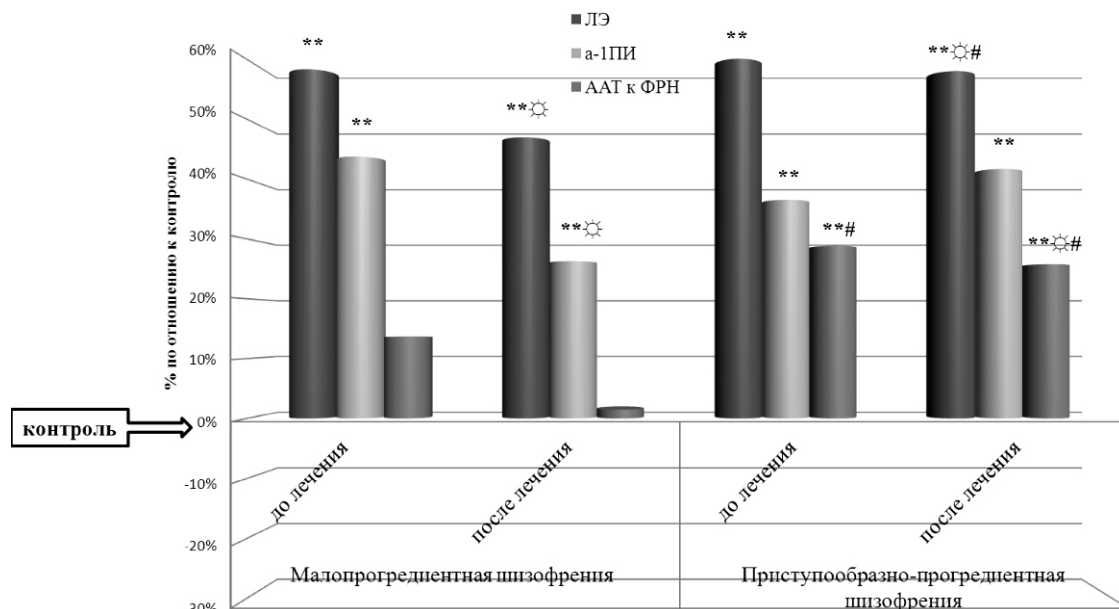


Рис. 3. Активность/уровень иммунологических показателей (ЛЭ, α -1ПИ и ААТ к фактору роста нервов) в сыворотке крови подростков с шизофренией:

** — достоверные отличия от контрольной группы, $p < 0,01$; # — достоверные различия между группами, $p < 0,01$; ☼ — достоверные различия между обследованием до лечения и после лечения, $p < 0,01$

в мозг и связываться с соответствующими мишенями, что приводит к нарушению их функционирования.

Нельзя также исключить, что запуск аутоиммунных реакций может быть связан с генетически обусловленным нарушением функционирования самой иммунной системы. Так, например, область хромосомы 6 в локусе HLA, связанная с повышенным риском аутоиммунных нарушений, ассоциирована в свою очередь с повышенным риском развития как РАС, так и шизофрении.

Отсутствие повышения уровня ААТ к нейроантигенам в общей группе детей с последствиями ПП ЦНС можно объяснить, с одной стороны, особенностями выборки пациентов: у большинства обследованных детей этой группы (52%) выявлены относительно легкие НФНС — лёгкая степень ЗПМР, обусловленная отсутствием выраженных морфологических изменений в мозге, не сопровождающихся деструкцией. Такой вариант НФНС является благоприятным с точки зрения компенсации нарушений и прогноза дальнейшего развития ребенка. С другой стороны, структурно-функциональные изменения мозга у детей с ПП ЦНС, обусловленные действием гипоксии, компенсируются, возможным связыванием вышедших в кровоток аутоантигенов (в случае прорыва ГЭБ) соответствующими ААТ и выведением их из организма в составе циркулирующих иммунных комплексов.

Детальный анализ полученных данных показал, что при обследовании до лечения в каждой подгруппе были выявлены пациенты со значительным повышением уровней ААТ к нейроантигенам. С учётом этого, в каждой подгруппе была определена доля гипериммунных сывороток к нейроантигенам, т.е. сывороток, уровень антител которых превышал 75-й процентиль контрольной группы, и сопоставление частоты встречаемости гипериммунных сывороток и сывороток с нормальным уровнем ААТ в каждой из изученных подгрупп пациентов.

Частота встречаемости гипериммунных сывороток в группах с наиболее тяжелыми формами НФНС существенно выше, чем в группах с относительно легкими формами. Установлено, что доля гипериммунных сывороток среди детей с последствиями ПП ЦНС достоверно выше у недоношенных детей по сравнению с доношенными (44% и 12,5% соответственно, $\chi^2 = 4,63$; $p = 0,03$), а также среди пациентов с тяжелой ЗПМР по сравнению с лёгкой ЗПМР (53% и 14% соответственно, $\chi^2 = 4,73$; $p = 0,03$).

Доля гипериммунных сывороток среди детей с РАС составляет 51% у пациентов с АДП, что достоверно выше чем в группе пациентов с ДП (10%) ($\chi^2 = 6,21$, $p < 0,01$). Доля гипериммунных сывороток среди подростков с шизофренией составляет 59%

у пациентов с ППШ, что достоверно выше чем в группе пациентов с МШ (16%) ($\chi^2 = 5,61$, $p < 0,01$).

Полученные результаты подтверждают и выявленные клиничко-биологические корреляции. Так в общей группе пациентов с РАС наблюдается отрицательная корреляция между уровнем ААТ к ФРН и суммарной оценкой по шкале РЕР: по аутистической подшкале ($r = 0,34$, $p < 0,01$), по когнитивной подшкале ($r = 0,28$, $p < 0,03$), свидетельствующая, что чем выше уровень ААТ, тем значительнее выражены аутистические и когнитивные расстройства у пациентов. Также выявлена положительная корреляция между уровнем ААТ к ФРН и оценкой степени аутизма по шкале CARS ($r = 0,34$, $p < 0,03$). Таким образом, чем выше уровень ААТ к ФРН, тем тяжелее клиническое состояние пациентов с РАС.

Подобные взаимосвязи наблюдаются и в общей группе пациентов с шизофренией: выявлена прямая корреляция между уровнем ААТ к ФРН и выраженностью клинической симптоматики по Шкале позитивных синдромов PANSS ($r = 0,59$, $p < 0,05$).

Таким образом, аутоиммунные реакции к нейроантигенам вовлечены в патологический процесс как экзогенных, так и эндогенных нарушений развития нервной системы. Повышение уровня ААТ, наблюдаемое в общей группе пациентов только при наиболее тяжелых эндогенных заболеваниях в стадии обострения (ДП, АДП и ППШ) может служить маркером тяжести текущего патологического процесса в нервной системе.

Повторное клиничко-иммунологическое обследование, проведённое после терапии, показало, что в обеих подгруппах детей с последствиями ПП ЦНС наблюдается снижение активности ЛЭ по сравнению с первым обследованием, достигающее уровня статистической значимости только в группе доношенных детей ($p < 0,01$). При этом активность ЛЭ у недоношенных детей после лечения по-прежнему превышает контрольные показатели ($p < 0,01$) и активность ЛЭ у доношенных детей ($p < 0,05$), что, вероятно, свидетельствует о более длительном процессе компенсации в этой подгруппе пациентов и отражает наличие текущего патологического процесса в нервной системе.

Активность α -1ПИ при повторном обследовании в обеих подгруппах детей с последствиями ПП ЦНС достоверно выше контрольных значений ($p < 0,05$). Между собой доношенные и недоношенные дети не отличались по активности α 1-ПИ.

Средний уровень ААТ в обеих подгруппах в динамике не отличался от контрольных значений.

В группе детей с РАС на фоне улучшения клинического состояния после терапии наблюдается сниже-

ние активности ЛЭ по сравнению с обследованием до лечения, достигающее достоверности только в подгруппе детей с ДП ($p < 0,05$). У пациентов с ДП это снижение было более выражено и достигало контрольных значений, что, предположительно, может свидетельствовать о достижении пациентами устойчивой терапевтической ремиссии. Напротив, при АДП (более тяжелой форме РАС) активность ЛЭ оставалась достоверно повышенной, как по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$), так и подгруппой с детским психозом ($p < 0,05$). Активность $\alpha 1$ -ПИ оставалась достоверно повышенной в обеих подгруппах пациентов ($p < 0,001$).

В подгруппе пациентов с АДП после лечения наблюдалось снижение уровня ААТ к нейроантигенам, не достигающее, однако, контрольных значений (для ААТ к ОБМ ($p < 0,01$)). Вероятно, повышенные значения иммунологических показателей у пациентов этой подгруппы после терапии отражают течение сохраняющегося патологического процесса.

Сходные изменения были выявлены и при изучении динамики иммунологических показателей у пациентов с шизофренией. Улучшение клинического состояния в период ремиссии у пациентов с МШ и ППШ сопровождалось достоверным снижением активности ЛЭ и α -1ПИ по сравнению с первым обследованием (кроме активности α -1ПИ у пациентов с ППШ) ($p < 0,05$). При этом активность изучаемых показателей по-прежнему превышала контрольные значения ($p < 0,05$). Активность ЛЭ у пациентов с ППШ оставалась достоверно выше, чем у пациентов с МШ ($p < 0,05$). Существенных изменений активности α -1ПИ в обследованных подгруппах в динамике не наблюдалось.

На фоне лечения уровень ААТ к ФРН достоверно изменился только в группе пациентов с ППШ, оставаясь при этом выше контроля ($p < 0,05$). При межгрупповом сравнении уровень ААТ к ФРН у пациентов с ППШ на фоне лечения оставался достоверно более высоким, чем у пациентов с МШ ($p < 0,05$).

Таким образом, активация показателей как врожденного, так и приобретенного иммунитета выявлена в крови детей и подростков при всех изученных формах НФНС. Показано, что изученные иммунологические показатели тесно коррелируют с особенностями клинического состояния пациентов. Комплексное использование этих показателей, отражающее взаимосвязи между врожденным и приобретенным иммунитетом, может служить дополнительным объективным критерием к клиническому обследованию пациентов всех групп для оценки текущего патологического процесса в нервной системе, а также для мониторинга их состояния.

Список литературы

1. Рогаткин С.О., Блинов Д.В., Володин Н.Н. и др. Перспективы применения иммуноферментного анализа нейроспецифических антигенов в перинатальной неврологии. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2003; 2(4): 8-13.
2. Pathmanandavel K., Starling J, Dale RC, Brilot F. Auto-antibodies and the immune hypothesis in psychotic brain diseases: challenges and perspectives. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013: 257184. doi: 1155/2013/257184. Epub 2013 aug 24.
3. Piras IS, Naapanen L, Napolioni V, Sacco R, Van de Water J, Persico AM. Anti-brain antibodies are associated with more severe cognitive and behavioral profiles in Italian children with Autism Spectrum Disorder. *Brain Behav Immun*. 2014; 3: S0889-1591.
4. *Актуальные проблемы нейрориммунологии* Руководство под редакцией Г.Н. Крыжановского, С.В. Магаевой, С.Г. Морозова, Москва, 2012.
5. Enstrom AM, Van de Water JA, Ashwood P. Autoimmunity in autism. *Curr Opin Investig Drugs*. 2009; 10(5): 463-73.
6. Hagberg H., Gressens P., Mallard C. Inflammation during fetal and neonatal life: implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults. *Ann. Neurol*. 2012; 71: 444-57.
7. Kronfol Z, Remick DG. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. *Am J Psychiatry*. 2000; 157: 683-94.
8. Холичев Д.А., Боженов Ю.А. Особенности течения воспалительной реакции у новорожденных детей с церебральной ишемией различной степени тяжести. *Дальневосточный медицинский журнал*, 2008; 1: 44-6.
9. Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah I, Van de Water J. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain Behav Immun*. 2011; 25(1): 40-5.
10. Zerbo O, Yoshida C, Grether JK, Van de Water J, Ashwood P, Delorenze GN, Hansen R.L. et al. Neonatal cytokines and chemokines and risk of Autism Spectrum Disorder: the Early Markers for Autism (EMA) study: a case-control study. *J Neuroinflammation*. 2014; 11: 113.
11. Шербак И.В., Каледа В.Г., Бархатова А.Н., Ключник Т.П. Маркеры эндотелиальной дисфункции при приступообразно-прогредиентной шизофрении *Журнал неврологии и психиатрии*. 2005; 105(3): 43-6.
12. Dickerson F., Stallings C., Origoni A. et al. C-reactive protein is elevated in schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 2013; 134(1): 198-202.
13. Miller B., Gassama B., Sebastian D., Buckley P. Meta-analysis of lymphocytes in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biol Psychiatry*, 2013, 73(10): 993-9.
14. Enstrom AM, Onore CE, Van de Water JA, Ashwood P. Differential monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun*. 2010; 24(1): 64-71.
15. Muller N., Wagner J.K., Krause D., Weidinger E., Wildenauer A., Obermeier M., Dehning S., Gruber R., Schwarz M. Impaired monocyte activation in schizophrenia. *Psychiatry Res*. 2012; 198(3): 341-6.
16. Ключник Т.П., Андросова Л.В., Симашкова Н.В. Состояние врожденного и приобретенного иммунитета у детей с психотическими формами расстройств аутистического спектра. *Журнал Неврологии и психиатрии им С.С. Корсакова*. 2011; 8: 41-5.
17. Аверьянов А.В. Роль нейтрофильной эластазы в патогенезе хронической обструктивной болезни лёгких. *Журнал Цитокины и воспаление*. 2007; 6(4): 3-8.
18. Domotor E, Bartha K, Machovich R, Adam-Vizi V. Protease-activated receptor-2 (PAR-2) in brain microvascular endothelium and its regulation by plasmin and elastase. *J Neurochem*. 2002; 80(5): 746-54.
19. Stockley RA. Alpha1-antitrypsin Review. *Clin Chest Med*. 2014; 35(1): 39-50.

20. Cabanlit M, Wills S, Goines P, Ashwood P, Van de Water J. Brain-specific autoantibodies in the plasma of subjects with autistic spectrum disorder. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1107: 92-103.

21. Козловская Г.В., Горюнова А.В. Психические нарушения у детей раннего возраста (клиника, эпидемиология, вопросы абилитации). Дисс. д-ра мед. наук. М., 1995, 283 с.

22. Schpler E., Reichler R. *Psychoeducation Profile* — PEP. 1979 Baltimore, University Park Press.

23. Schopler E., Reichler R.J., Renner B.R. *The childhood Autism Rating Scale — CARS.* Los Angeles, CA. 1988.

24. Kay S.R., Fiszbein A., Opler L.A. Positive and Negative Syndrome Scale — PANSS, 1987.

25. Парфенкова В.Г., Оглоблина О.Г., Домба Г.Ю. Дисбаланс протеиназиоингибиторной системы плазмы крови при семейной гиперхолестеринемии. *Кардиология.* 1989; 9: 94-6.

26. Visser J., Blout E. The use of p-nitrophenyl N-tert-butyl-oxycarbonyl-L-alanine as substrate for elastase. *Biochem. Biophys. Acta.* 1972; V.268: 257-60.

27. Нартикова В.Ф., Пасхина Т.С. Унифицированный метод определения активности α 1-антитрипсина и α 2-макроглобулина в сыворотке крови человека. *Вопросы мед. химии.* 1977; 25(4): 494-9.

Поступила 29.06.15

References

1. Rogatkin S.O., Blinov D.V., Volodin N.N. Prospects for the use of immunoassay neurospecific antigens in perinatal neurology. *Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii.* 2003; 2(4), 8-13. (in Russian)

2. Pathmanandavel K., Starling J, Dale RC, Brilot F. Autoantibodies and the immune hypothesis in psychotic brain diseases: challenges and perspectives. *Clin Dev Immunol.* 2013;257-84.

3. Piras IS, Haapanen L, Napolioni V, Sacco R, Van de Water J, Persico AM. Anti-brain antibodies are associated with more severe cognitive and behavioral profiles in Italian children with Autism Spectrum Disorder. *Brain Behav Immun.* 2014, № 3, S0889-1591.

4. Actual problems of neuroimmunology [Aktualnye problem nyroimmunologii] The textbook edited by Kryzhanovsky G.N., Magaeva S.V., Morozov S.G, 2012, Moscow. (in Russian)

5. Enstrom AM, Van de Water JA, Ashwood P. Autoimmunity in autism. *Curr Opin Investig Drugs.* 2009; 10(5): 463-73.

6. Hagberg H., Gressens P., Mallard C. Inflammation during fetal and neonatal life: implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults. *Ann. Neurol.* 2012; 71: 444-57.

7. Kronfol Z, Remick DG. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. *Am J Psychiatry.* 2000; 157: 683-94.

8. Holichev D.A., Bozhenov U.A. Peculiarities of the inflammatory response in neonates with cerebral ischaemia varying degrees of severity. *Dalnevostochniy medicinskiy zhurnal.* 2008; 1: 44-6. (in Russian)

9. Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah I, Van de Water J. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain Behav Immun.* 2011; 25(1): 40-5.

10. Zerbo O, Yoshida C, Grether JK, Van de Water J, Ashwood P, Delorenze GN, Hansen RL et al. Neonatal cytokines and chemokines and risk of Autism Spectrum Disorder: the Early Markers for Autism (EMA) study: a case-control study. *J Neuroinflammation.* 2014; 11: 113.

11. Shcherbakova I.V., Kaleda V.G., Barhatova A.N., Klyushnik T.P. Markers of endothelial dysfunction in cases of shift-like schizophrenia. *Zhurnal neurologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova.* 2005; 105(3): 43-6. (in Russian)

12. Dickerson F., Stallings C., Origoni A. et al. C-reactive protein is elevated in schizophrenia. *Schizophrenia Resear.* 2013; 134(1): 198-202.

13. Miller B., Gassama B., Sebastian D., Buckley P. Meta-analysis of lymphocytes in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biol Psychiatry.* 2013, 73(10): 993-9.

14. Enstrom AM, Onore CE, Van de Water JA, Ashwood P. Differential monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun.* 2010; 24(1): 64-71.

15. Muller N., Wagner J.K., Krause D., Weidinger E., Wildenauer A., Obermeier M., Dehning S., Gruber R., Schwarz M. Impaired monocyte activation in schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2012, 198(3): 341-6.

16. Klyushnik T.P., Androsova L.V., Simashkova N.V. The status of innate and adaptive immunity in case of childrens psychotic forms of autism spectrum disorder. *Zhurnal neurologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova.* 2011; 8: 41-5. (in Russian)

17. Averianov A.V. The role of neutrophil elastase in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J. Cytokines and inflammation.* 2007; 6(4): 3-8.

18. Domotor E, Bartha K, Machovich R, Adam-Vizi V. Protease-activated receptor-2 (PAR-2) in brain microvascular endothelium and its regulation by plasmin and elastase. *J Neurochem.* 2002; 80(5): 746-54.

19. Stockley RA. Alpha1-antitrypsin Review. *Clin Chest Med.* 2014; 35(1): 39-50.

20. Cabanlit M, Wills S, Goines P, Ashwood P, Van de Water J. Brain-specific autoantibodies in the plasma of subjects with autistic spectrum disorder. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1107: 92-103.

21. Kozlovskaya G.V., Gorunova A.V. *Mental disorders in early childhood.* Diss. Moscow, 1995, 283 p. (in Russian)

22. Schpler E., Reichler R. *Psychoeducation Profile* — PEP. 1979 Baltimore, University Park Press.

23. Schopler E., Reichler R.J., Renner B.R. *The childhood Autism Rating Scale — CARS.* Los Angeles, CA. 1988.

24. Kay S.R., Fiszbein A., Opler L.A. *Positive and Negative Syndrome Scale — PANSS,* 1987.

25. Parfenkova V.G., Oglloblina O.G., Domba G.U. Imbalance of the proteinase inhibitor system of blood plasma in familial hypercholesterolemia. *Kardiologiya.* 1989; 9: 94-6. (in Russian)

26. Visser J., Blout E. The use of p-nitrophenyl N-tert-butyl-oxycarbonyl-L-alanine as substrate for elastase. *Biochem. Biophys. Acta.* 1972.V.268, 257-60.

27. Nartikova N.F., Pashkina T.S., A method for estimation of α 1-antitrypsin and of α 2-macroglobulin in human blood serum (plasma) in normal state and under some pathological conditions. *Biomeditsinskaya Khimiya (former Problems of Medical Chemistry).* 1979; 25 (4): 494-9. (in Russian)

Received 29.06.15

Сведения об авторах:

Зозуля Светлана Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. нейроиммунологии

Сарманова Зоя Викторовна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. нейроиммунологии

Клюшник Татьяна Павловна, доктор мед. наук, проф., директор ФГБНУ НЦПЗ, зав. лаб. нейроиммунологии

Чаусова С.В.¹, Гуревич К.Г.³, Бондарева Г.П.², Филатов О.Ю.³, Малышев И.Ю.³

Роль клеточных медиаторов в развитии феномена ингибирования стимулированной сульфатом бария люминолзависимой хемилюминесценции крови под влиянием нестероидных противовоспалительных препаратов у пациентов с непереносимостью данных препаратов

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

² — ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, отделение «Бронхиальной астмы», Москва, Каширское шоссе, д. 24, корп. 2

³ — ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, 103473, Москва, ул. Делегатская, д. 20/1

Определяли вклад медиаторного механизма в развитие феномена ингибирования стимулированной сульфатом бария люминол-зависимой хемилюминесценции (СЛХЛ) крови под влиянием нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) у пациентов с их непереносимостью. Было выявлено, что феномен подавления СЛХЛ крови под влиянием НПВП у больных с их непереносимостью опосредуется участием медиаторов, причем вклад H1- и H2-гистаминовых, 5-HT2 серотониновых и цис-лейкотриеновых рецепторов в развитие указанного феномена зависит от химической природы НПВП и от клинических проявлений непереносимости.

Ключевые слова: хемилюминесценция, непереносимость нестероидных противовоспалительных препаратов, медиаторы, клемастин, ранитидин, кетансерин, зафирлукаст, интал

Chausova S.V.¹, Gurevich K.G.³, Bondareva G.P.², Filatov O.Ju.³, Malyshev I.Y.³

The role of cellular mediators in the development of the phenomenon of inhibition induced by barium sulfate luminol-dependent chemiluminescence of blood under the influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs in patients with intolerance to these drugs

¹ — Russian National Research Medical University, 1, Ostrovityanova st., Moscow, 117997, Russia

² — Institute of Immunology, 24/2, Kashirskaya st., Moscow, 115478, Russia

³ — Moscow State Medical and Dental University, 20/1, Delegatskaya st., Moscow, 103473, Russia

We investigated contribution mediator mechanism in the development of the phenomenon of inhibition induced by barium sulfate luminol-dependent chemiluminescence (SLCHL) of blood under the influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in patients with intolerance to these drugs. It was found that the phenomenon of suppression SLCHL blood under the influence of NSAIDs in patients with intolerance is mediated by the participation of mediators, and the contribution of H1 — and H2 — histamine receptors, 5-HT2 serotonin receptors and Cys-leukotriene receptors in the development of that phenomenon depends on the chemical nature of NSAIDs and the clinical manifestations of intolerance.

Key words: chemiluminescence; non-steroidal anti-inflammatory drugs intolerance; mediators; clemastine; ranitidine; ketanserine; zafirlucast, intal

В 1985 году был открыт феномен специфического угнетения аллергеном стимулированной сульфатом бария люминол-зависимой хемилюминесценции лейкоцитов (СЛХЛ) периферической крови sensibilized людей [1]. На основе этого феномена

разработан тест для выявления специфической сенсibilизации к пылевому, бытовому, лекарственным (пенициллин) и другим аллергенам. Используемые аллергены являются либо полноценными антигенами, либо гаптенами (пенициллин), образующими в организме комплексный антиген. Позже нами было установлено изменение СЛХЛ крови при псевдоаллергии. Так, добавление нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) к пробам крови паци-

Для корреспонденции: Чаусова Светлана Витальевна, канд. мед. наук, доцент каф. общей патологии медико-биологического факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова, e-mail: svetlana_chau@mail.ru

ентов с непереносимостью этих препаратов также вызвало угнетение СЛХЛ крови, которое оказалось дозозависимым [2]. По результатам исследований был разработан безопасный и экономичный тест *in vitro* для диагностики непереносимости НПВП [2]. Также нами было доказано, что отсутствуют какие-либо особенности в работе ферментов окислительного метаболизма выделенных полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПМЛ), проявляющиеся под влиянием НПВП, у больных с непереносимостью данных препаратов [3]. Из этого может следовать, что различия в показателях СЛХЛ цельной крови данных больных по сравнению с донорами при прединкубации крови с НПВП связаны с влиянием на ферменты окислительного метаболизма ПМЛ находящихся в плазме крови биологически активных веществ (медиаторов, цитокинов). Для выяснения вклада медиаторного механизма в развитие феномена ингибирования СЛХЛ крови под влиянием НПВП было проведено настоящее исследование.

Методика

Объектом исследования были 58 пациентов с непереносимостью аспирина и/или анальгина и/или диклофенака натрия в возрасте от 22 до 67 лет (36 женщин, 22 мужчины), из них у 29 — повышенная чувствительность к НПВП проявлялась клинически в виде бронхоспазма/ринита, у 29 — в виде крапивницы/отека Квинке. В крови всех обследованных пациентов специфических IgE к салицилатам, метамизолу и диклофенаку натрия не было выявлено.

Показания к включению пациентов в исследование: приступы экспираторного диспноэ, ринит, крапивница, отек Квинке при приеме НПВП (аспирин, анальгин или диклофенака натрия) в любой лекарственной форме (инъекции, таблетки, драже).

Противопоказания к включению пациентов в исследование: прием антигистаминных, антисеротониновых, антилейкотриеновых препаратов, интала, НПВП за 2 недели и менее до исследования.

Все включенные в работу лица дали письменное добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Клиническое исследование одобрено Межвузовским Комитетом по этике, протокол № 05-12 от 17.05.2012 г.

Для исследования использовали гепаринизированную венозную кровь объемом 5 мл (концентрация гепарина — 50 ЕД/мл).

Для определения участия медиаторов в развитии вызываемого НПВП феномена ингибирования СЛХЛ крови использовали хемилюминесцентный метод. Непосредственно перед проведением исследования во взятых образцах цельной крови производили

подсчет лейкоцитарной формулы с определением количества и жизнеспособности ПМЛ. Из образцов цельной крови отбирали объемы, содержащие 1×10^6 лейкоцитов, и доводили их до 0,68 мл средой Хенкса (в опытах с клемастином, ранитидином и инталом); до 0,687 мл (в опытах с кетансерином и зафирлукастом). Затем в пробы вносили 0,01 мл растворов клемастина, ранитидина, интала; 0,003 мл растворов кетансерина, зафирлукаста в конечных концентрациях, эквивалентных 1 средней терапевтической дозе (ЭСТД), после чего инкубировали в течение 15 минут при 37°C при постоянном перемешивании. В качестве разводящей жидкости для клемастина, ранитидина и интала использовали физиологический раствор, для кетансерина и зафирлукаста — диметилсульфоксид. Далее в пробы добавляли 0,01 мл раствора салицилата, метамизола или диклофенака натрия в конечных концентрациях 3 мМ, 6 мкМ, 6 мкМ соответственно. Затем пробы повторно инкубировали еще 45 минут в тех же условиях. Салицилат натрия (порошок, Екатеринбургская фарм. фабрика, Россия) и метамизол натрия (порошок, Медокеми Лтд, Кипр) растворяли в физиологическом растворе, диклофенак натрия (порошок, Фармстандарт, Россия) — в воде для инъекций. К контрольным пробам добавляли растворы клемастина, ранитидина, интала, кетансерина и зафирлукаста, соответственно, в смеси с разводящей жидкостью для используемого НПВП. Жизнеспособность ПМЛ, определяемая окрашиванием трипановым синим, за время инкубации существенно не изменялась. После инкубации проводили измерение интенсивности хемилюминесценции (ХЛ) проб на 36-кюветном биохемилюминесцентном анализаторе БЛМ 3606-01 (г.Красноярск), сигнал от которого поступал на персональный компьютер и анализировался с помощью программы VLM-Obrab. В качестве активатора свечения использовали люминол (отражает суммарную продукцию активных форм кислорода (АФК) ПМЛ) [4]. В кювету хемилюминометра вносили 0,7 мл пробы после инкубации и 0,15 мл активатора (2 мМ). Далее измеряли уровень спонтанной ХЛ. После регистрации спонтанной ХЛ добавляли 0,15 мл стимулятора свечения — сульфата бария (2 мг/мл) и регистрировали уровень стимулированной ХЛ. Измерение ХЛ крови проводили в режиме постоянного перемешивания при температуре 37°C.

С помощью компьютерной программы VLM-Obrab определяли площадь под кривой ХЛ ($S_{ХЛ}$), отражающую светосумму ХЛ. Для оценки результатов определяли относительную светосумму свечения или индекс соотношения площадей под кривыми (ИП), как отношение $S_{ХЛ}$ опытной пробы (с НПВП в смеси

с блокаторами рецепторов или инталом) к $S_{xл}$ контрольной пробы.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением программ «STATISTICA» версия 7.0 и Excel 2007. Все результаты в данной работе представляли в виде $M \pm m$ (M — среднее арифметическое для анализируемой группы показателей, m — ошибка среднего). Соответствие закона распределения нормальному устанавливали с помощью λ -критерия Колмогорова—Смирнова. Статистическую достоверность отличия измеряемых величин определяли, используя критерий Манна—Уитни. Различия считали достоверно значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В таблице представлено влияние блокатора H1-гистаминовых рецепторов — клемастина, блокатора H2-гистаминовых рецепторов — ранитидина, блокатора 5-HT2 серотониновых рецепторов — кетансерина, блокатора цис-лейкотриеновых рецепторов — зафирлукаста и стабилизатора мембран базофилов и тучных клеток — интала на изменение СЛХЛ крови под влиянием НПВП у пациентов с различными клиническими проявлениями непереносимости: с реакциями на НПВП со стороны органов дыхания (бронхоспазм/ринит)- группа 1 или со стороны кожных покровов (крапивница/отек Квинке) — группа 2.

Как видно из данных таблицы, эффекты клемастина, ранитидина, кетансерина, зафирлукаста и интала различны у пациентов с непереносимостью НПВП различной химической природы, имеющих различные клинические проявления.

Можно сделать следующее обобщение об особенностях рецепторной реализации феномена ингибирования СЛХЛ крови под воздействием исследуемых НПВП у пациентов с их непереносимостью, и возможно, также о рецепторной реализации механизмов непереносимости НПВП:

H1-гистаминовые рецепторы вносят существенный вклад в реализацию подавления СЛХЛ крови у всех пациентов с непереносимостью аспирина, анальгина, а также у пациентов с непереносимостью диклофенака 1 группы, причем указанные рецепторы экспрессируются в большей степени у пациентов с непереносимостью аспирина 1 группы. У пациентов с непереносимостью диклофенака 2 группы H1-гистаминовые рецепторы в меньшей степени опосредуют реализацию специфического подавления диклофенаком СЛХЛ крови.

H2-гистаминовые рецепторы вносят существенный вклад в реализацию подавления СЛХЛ крови

у всех пациентов с непереносимостью аспирина и анальгина, а также у пациентов с непереносимостью диклофенака натрия 2 группы. У пациентов с непереносимостью диклофенака 1 группы H2-гистаминовые рецепторы вносят незначительный вклад в реализацию подавления СЛХЛ крови. При этом вклад H2-гистаминовых рецепторов у пациентов с непереносимостью анальгина 1 группы и у пациентов с непереносимостью диклофенака натрия 1 группы выражен в меньшей степени по сравнению с вкладом H1-гистаминовых рецепторов. У пациентов с непереносимостью диклофенака натрия 2 группы, напротив, вклад H2-гистаминовых рецепторов более выражен по сравнению с вкладом H1-гистаминовых рецепторов. У пациентов с непереносимостью анальгина 2 группы и у всех пациентов с непереносимостью аспирина оба типа рецепторов принимают одинаковое участие в реализации гистаминового механизма.

Серотониновые 5-HT2 рецепторы вносят существенный вклад в реализацию подавления СЛХЛ крови у всех пациентов с непереносимостью анальгина, а также у пациентов с непереносимостью аспирина и диклофенака натрия 2 группы. У пациентов с непереносимостью диклофенака натрия 1 группы вклад указанных рецепторов выражен незначительно. У пациентов с непереносимостью аспирина 1 группы серотониновые 5-HT2 рецепторы не участвуют в патогенезе феномена специфического подавления салицилатом натрия СЛХЛ крови.

Цис-лейкотриеновые рецепторы (цисЛТ1R) вносят существенный вклад в реализацию подавления СЛХЛ крови у всех пациентов с непереносимостью аспирина, анальгина. У пациентов с непереносимостью диклофенака натрия вклад цис-лейкотриеновых рецепторов выражен слабее.

Поскольку стабилизатор мембран базофилов и тучных клеток интал в значительной степени отменял развитие феномена ингибирования СЛХЛ крови у всех пациентов с непереносимостью аспирина, анальгина, а также у пациентов с непереносимостью диклофенака натрия 2 группы, мы склонны полагать, что медиаторы базофилов в определенной мере участвуют в патогенезе наблюдаемого феномена у данных пациентов. У пациентов с непереносимостью диклофенака 1 группы интал оказывал слабое влияние на эффект подавления диклофенаком СЛХЛ крови.

По-видимому, медиаторы, воздействуя на фагоцитирующие ПМЛ, способны изменять активность ферментов окислительного метаболизма ПМЛ и, следовательно, модифицировать СЛХЛ крови. В частности, при изучении влияния гистамина, используемого в различных концентрациях, на окислительный метаболизм ПМЛ было выявлено, что гиста-

мин дозозависимо изменяет активность НАДФН-оксидазной и миелопероксидазной ферментных систем ПМЛ [5]. Установлено также дозозависимое модулирующее влияние серотонина на окислительный метаболизм фагоцитов [6]. Показано, что в концентрациях, превышающих физиологические, серотонин оказывает ингибирующее влияние на окислительный метаболизм фагоцитов [6], что объясняется его способностью индуцировать образование эндогенной цистионин- β -синтетазы, обеспечивающей торможение процессов генерации АФК [7]. Наше предположение хорошо соотносится с результатами экспериментальных и клинических исследований, доказывающих, что при непереносимости ацетилсалициловой кислоты аспирин провоцирует синтез и высвобождение лимфоцитами периферической крови 15-гидроксиэйкозатетраеновой кислоты, сульфидолейкотриенов *in vitro* по сравнению с толерантными к указанному препарату лицами [8], стимулирует высвобождение биогенных аминов (гистамина, серотонина) из тромбоцитов, базофилов, тучных клеток [9]. Последнее подтверждается тем

фактом, что у больных реакция на НПВП нередко сопровождается увеличением гистамина в плазме крови и его выведения с мочой [10].

Заключение

В работе доказано, что феномен подавления СЛХЛ крови под влиянием НПВП у больных с их непереносимостью опосредуется участием медиаторов, что подтверждается достоверным ($p < 0,05$) ослаблением или предотвращением развития указанного феномена под воздействием клемастина, ранитидина, кетансерина, зафирлукаста и интала. Вклад Н1- и Н2- гистаминовых, 5-НТ2 серотониновых и дис-лейкотриеновых рецепторов в развитие феномена ингибирования СЛХЛ крови под воздействием НПВП зависит от химической природы НПВП и от клинических проявлений непереносимости, что свидетельствует о разных рецепторных механизмах формирования непереносимости НПВП различных химических групп у пациентов с различными клиническими проявлениями непереносимости.

Таблица

Влияние клемастина, ранитидина, кетансерина, зафирлукаста и интала на изменение СЛХЛ крови под воздействием НПВП у пациентов с их непереносимостью, имеющих реакции со стороны органов дыхания (группа 1) или со стороны кожных покровов (группа 2)

Тестируемые агенты	ИП, отн. ед.		Здоровые доноры
	Больные с реакцией на НПВП со стороны органов дыхания (группа 1)	Больные с реакцией на НПВП со стороны кожных покровов (группа 2)	
Салицилат натрия (3 мМ)	0,74 ± 0,04 [#]	0,67 ± 0,04 [#]	1,09 ± 0,09
Клемастин (1 ЭСТД) + салицилат натрия (3 мМ)	0,95 ± 0,04 [*]	0,85 ± 0,05 ^{**}	
Ранитидин (1 ЭСТД) + салицилат натрия (3 мМ)	0,94 ± 0,04 [*]	0,83 ± 0,05 ^{**}	
Кетансерин (1 ЭСТД) + салицилат натрия (3 мМ)	0,70 ± 0,06 [#]	0,87 ± 0,05 ^{**}	
Зафирлукаст (1 ЭСТД) + салицилат натрия (3 мМ)	0,86 ± 0,03 ^{**}	0,88 ± 0,04 ^{**}	
Интал (1 ЭСТД) + салицилат натрия (3 мМ)	0,89 ± 0,03 ^{**}	0,88 ± 0,04 ^{**}	
Метамизол натрия (6 мкМ)	0,71 ± 0,03 [#]	0,69 ± 0,05 [#]	1,17 ± 0,08
Клемастин (1 ЭСТД) + метамизол натрия (6 мкМ)	0,92 ± 0,05 ^{**}	0,83 ± 0,04 ^{**}	
Ранитидин (1 ЭСТД) + метамизол натрия (6 мкМ)	0,83 ± 0,05 ^{**}	0,82 ± 0,02 ^{**}	
Кетансерин (1 ЭСТД) + метамизол натрия (6 мкМ)	0,93 ± 0,07 ^{**}	0,90 ± 0,03 ^{**}	
Зафирлукаст (1 ЭСТД) + метамизол натрия (6 мкМ)	0,94 ± 0,06 ^{**}	0,85 ± 0,02 ^{**}	
Интал (1 ЭСТД) + метамизол натрия (6 мкМ)	0,87 ± 0,06 ^{**}	0,92 ± 0,05 ^{**}	
Диклофенак натрия (6 мкМ)	0,87 ± 0,04 [#]	0,84 ± 0,06 [#]	1,78 ± 0,17
Клемастин (1 ЭСТД) + диклофенак натрия (6 мкМ)	1,24 ± 0,04 ^{**}	1,02 ± 0,04 ^{**}	
Ранитидин (1 ЭСТД) + диклофенак натрия (6 мкМ)	1,03 ± 0,06 ^{**}	1,26 ± 0,08 ^{**}	
Кетансерин (1 ЭСТД) + диклофенак натрия (6 мкМ)	1,04 ± 0,07 ^{**}	1,25 ± 0,09 ^{**}	
Зафирлукаст (1 ЭСТД) + диклофенак натрия (6 мкМ)	1,12 ± 0,08 ^{**}	1,18 ± 0,09 ^{**}	
Интал (1 ЭСТД) + диклофенак натрия (6 мкМ)	1,0 ± 0,04 ^{**}	1,39 ± 0,13 [*]	

Примечание. * — $p < 0,05$ относительно ИП больных с непереносимостью анальгина; # — $p < 0,05$ относительно ИП здоровых доноров.

Список литературы

References

1. Пыцкий В.И., Сюсюкин Ю.П., Филатов О.Ю., Шерстнев М.П. Способ выявления сенсибилизации организма при аллергических заболеваниях. Авторское свидетельство №1436643. Приоритет 13.12.85. Зарегистрир. 8.07.88.
2. Чаусова С.В., Гуревич К.Г., Бондарева Г.П., Филатов О.Ю., Малышев И.Ю. Возможность диагностики непереносимости нестероидных противовоспалительных препаратов по изменению хемилюминесцентного свечения полиморфно-ядерных лейкоцитов периферической крови. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2014; 4: 121-32.
3. Чаусова С.В., Гуревич К.Г., Усанова Е.А. и др. Влияние нестероидных противовоспалительных препаратов на хемилюминесценцию полиморфно-ядерных лейкоцитов у пациентов с непереносимостью данных препаратов. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2014; 77(5): 28-31.
4. Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция. *Успехи биологической химии*. 2009; 49: 341-88.
5. Искусных А. Ю., Башарина О. В., Артюхов В. Г., Алабовский В. В. Влияние гистамина на функциональные свойства нейтрофилов и интенсивность процесса пероксидного окисления нейтрофилов в крови доноров. *Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2008; 1: 93-6.
6. Бизунок Н.А. Биогенные амины — эндогенные модуляторы клеточной генерации активных форм кислорода. *Белорусский медицинский журнал*. 2004; 4: 34-6.
7. Шур В.Ю., Самотруева М.А., Мажитова М.В., Тризно Н.Н., Файзиев Р.М., Петренко Л.В., Шур Ю.В. Серотонин: биологические свойства и перспективы клинического применения. *Фундаментальные исследования*. 2014; 7: 621-9.
8. Kim MS, Cho YJ. Flow Cytometry-Assisted Basophil Activation Test as a Safe Diagnostic Tool for Aspirin/NSAID Hypersensitivity. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2012; 4(3): 137-42.
9. Kowalski M.L., Makowska J.S. Аспирин-зависимые заболевания органов дыхания. Современные подходы к диагностике и лечению. *Allergy Clin. Immunol. Int. J. World Allergy Org. Russ. Ed*. 2007; 2(1): 12-22.
10. Пыцкий В.И., Адрианова Н.В., Артомасова А.В. Аллергические заболевания / под ред. В.И. Пыцкого. М.: Издательство «Триада-Х», 1999.

1. Pytsky V.I., Susukin Ju.P., Filatov O.Ju., Sherstnev M.P. Method of detecting sensibilization in allergic diseases. Avtorskoje svidetel'stvo №1436643. Prioritet 13.12.85. Zaregistririvan 8.07.88.
2. Chausova S.V., Gurevich, K.G., Bondareva G.P., Filatov O.Ju., Malyshev I. Ju. Ability to diagnose intolerance to nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the change of the chemiluminescent light emission of polymorphonuclear leukocytes peripheral blood. *Patol. Fiziol. Eksp. Ter*. 2014; 4: 121-32. (in Russian)
3. Chausova S.V., Gurevich K.G., Usanova E.A. The effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes in patients with intolerance to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Eksp. Klin. Farm*. 2014; 77 (5): 28-31. (in Russian)
4. Vladimirov Ju.A., Proskurina E.V. Free radicals and cellular chemiluminescence. *Uspekhi biologicheskoy khimii*. 2009; 49: 341-88. (in Russian)
5. Iskusnykh A.Ju., Basharina O.V., Artukhov V.G., Alabovskij V.V. The effect of histamine on the functional properties of neutrophils and the intensity of the peroxide oxidation process of neutrophils in blood donors. *Vestnik VGU, Serija: Khimija. Biologija. Farmacija*. 2008; (1): 93-6. (in Russian)
6. Bisunok N.A. Biogenic amines — endogenous modulators of cellular generation of reactive oxygen species. *Belarus. Med. Zh*. 2004; 4: 34-6.
7. Shur V.Y., Samotruyeva M.A., Mazhitova M.V., Trizno N.N., Fayziev R.M., Petrenko L.V., Shur, Y.V. Serotonin: biological properties and perspective clinical application. *Fundamental. Issledovanija*. 2014; 7: 621-29. (in Russian)
8. Kim MS, Cho YJ. Flow Cytometry-Assisted Basophil Activation Test as a Safe Diagnostic Tool for Aspirin/NSAID Hypersensitivity. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2012; 4(3): 137-42.
9. Kowalski M. L., Makowska J. S. Aspirin-sensitive respiratory diseases. New approaches to diagnosis and treatment. *Allergy Clin. Immunol. Int. J. World Allergy Org. Russ. Ed*. 2007; 2(1): 12-22.
10. Pytsky V.I., Adrianova N.V., Artomasova A.V. Allergic diseases /pod red. V.I. Pytskogo-M: Izdatel'stvo «Triada-X», 1999. (in Russian)

Поступила 30.06.15

Received 30.06.15

Сведения об авторах:

Гуревич Константин Георгиевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. ЮНЕСКО «Здоровый образ жизни — залог успешного развития» Московского государственного медико-стоматологического университета, e-mail: kigurevich@mail.ru

Бондарева Галина Петровна, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии ФМБА России», отделение «Бронхиальная астма», e-mail: bondarev-galina@yandex.ru

Филатов Олег Юрьевич, доктор мед. наук, проф. каф. патологической физиологии лечебного факультета Московского государственного медико-стоматологического университета, e-mail: helge@bk.ru

Малышев Игорь Юрьевич, зав. каф. патологической физиологии лечебного факультета Московского государственного медико-стоматологического университета, доктор мед. наук, проф., e-mail: Iymalyshev1@mail.ru

Волков Е.Е.¹, Решетняк В.К.², Домарацкая Е.И.³, Волков А.Е.⁴,
Кучеряну В.Г.², Буторина Н.Н.³, Паюшина О.В.³

Влияние низкочастотной электростимуляции на регенерацию костной ткани

¹ — Клиника преморбидных и неотложных состояний ФКУ «МУНКЦ» им. П.В. Мандрыка МО РФ, 121002, Москва, Серебряный переулоч, д.4

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

³ — ФГБНУ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, д. 26

⁴ — ООО «Медицинский центр Хуанди», 125252 Москва, ул. 2-я Песчаная, д. 8, пом. 1

Исследование выполнено на 30 крысах самцах линии Wistar (вес 330—360 г, возраст 3,5 мес.). На экспериментальной модели повреждения бедренной кости в области тазобедренного сустава изучали влияние низкочастотной электростимуляции зоны повреждения на скорость регенерации кости. Животных разделяли на две группы. Контрольную (15 крыс) и опытную (15 крыс). У опытных животных проводили стимуляцию области травмы по 5 мин ежедневно в течение 7 сут., 14 сут. и 21 сут. Стимуляцию осуществляли с помощью прибора «Остеон-1» генерирующего смешанный сигнал из двух импульсных напряжений разной скважности, один из которых модулирован более высокой частотой. Сигналы были не синхронизированными относительно друг друга, однополярными с изменяющимися частотами и амплитудами. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности электростимуляции токами низкой частоты при восстановлении костной ткани после повреждения. Морфологические исследования показали, что электростимуляция ускоряет темп регенерации поврежденной кости на всех сроках изучения (7, 14, 21 сут.), вызывает более выраженную интеграцию новообразованной кости со старой неповрежденной костью и способствуют формированию более мощной периостальной мозоли по сравнению с контролем.

Ключевые слова: низкочастотная электростимуляция, повреждение кости, регенерация кости

Volkov E.E.¹, Reshetniak V.K.², Domaratskaia E.I.³, Volkov A.E.⁴,
Kucheranu V.G.², Butorina N.N.³, Paulina O.V.³

The effect of low frequency electrical stimulation on bone tissue regeneration

¹ — Clinic pre-morbid and emergency conditions FCU «MONKS» them P.V. Mandryka MO, 121002 Moscow, Silver lane, 4

² — FSBI research Institute of General pathology and pathophysiology, 125315 Moscow, the Baltic St.8

³ — FSBI Institute of biology of development, N.K. Koltsov Academy of Sciences, 119334, Moscow, Vavilov St, 26

⁴ — LLC «Medical center HuanDi», 125252 Moscow, 2 Peschanai 8, Pom 1

The study was performed on 30 male rats of Wistar line (weight 330—360 g, age 3.5 months). In an experimental model of damage to the femur bone in the hip joint studied the effect of low frequency electrical stimulation of the damaged area on the rate of regeneration of bone. The animals were divided into two groups. Control (15 rats) and experienced (15 rats). In the experimental animals underwent stimulation of the injury site for 5 min daily for 7 days, 14 days and 21 days. Stimulation was carried out using a device «Osteon-1» generating a mixed signal of two voltage pulse of varying duty cycle, one of which is modulated to a higher frequency. Signals were not synchronized with respect to each other, unipolar with varying frequencies and amplitudes. The obtained results show the effectiveness of the electrical stimulation currents of low frequency in the restoration of bone tissue after damage. Morphological studies showed that electrical stimulation to accelerate the regeneration of damaged bone at all stages of the study (7, 14, 21 day), causes a more pronounced integration of newly formed bone with the old intact bone and promote the formation of more powerful periosteal calluses in comparison with the control.

Key words: low-frequency electrical stimulation, damage to the bone, the bone regeneration

Введение

В большинстве стран мира отмечается значительное снижение смертности, вследствие этого увеличение продолжительности жизни и, соответственно, старение населения [1]. Однако улучшение деятель-

ности здравоохранения еще не означает улучшение качества жизни, как отдельного индивидуума, так и всего общества в целом. [2]. К сожалению, прогресс, достигнутый в увеличении продолжительности жизни, не сопровождается прогрессом в уменьшении инвалидизации пожилых людей.

Следует подчеркнуть, что количество пожилых людей во всем мире стремительно увеличивается. В частности, в Российской Федерации в настоящее время доля пенсионеров по старости составляет 20,6% [3].

Для корреспонденции: Решетняк Виталий Кузьмич, доктор мед. наук, зав. лабораторией общей патологии нервной системы ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии, профессор, член-корреспондент РАН; e-mail: vkr46@yandex.ru

Остеопороз входит в число наиболее актуальных проблем современного здравоохранения. В России остеопорозом страдают 14 млн чел. старше 50 лет. Еще у 20 млн обнаруживается остеопения [4, 5]. Остеопороз занимает четвертое место по частоте инвалидизации после болезней сердечно-сосудистой системы, сахарного диабета и онкологических заболеваний.

Согласно данным ВОЗ, этим заболеванием страдают около 75 млн граждан Европы, США и Японии. В связи с постарением населения Европы к 2050 г. ожидается рост количества остеопоротических переломов шейки бедренной кости с 500 тыс. до 1 млн случаев ежегодно [6]. Особенно часто остеопороз встречается у пожилых женщин вследствие снижения уровня половых гормонов. Помимо переломов отмечается также устойчивый рост дегенеративно-дистрофических заболеваний суставов (остеоартроз, остеопороз, асептический некроз). Заболевания суставов сопровождаются хронической болью. Исследования, проведенные в США, показали, что у женщин, испытывающих боль, падения случаются в 1,66 раз чаще [7], а это при остеопорозе в большинстве случаев неизбежно приводит к перелому костей.

Общим патогенетическим механизмом этой группы заболеваний является нарушение структуры костной ткани, сопровождающееся сложным локальным или системным нарушением процессов костного ремоделирования.

Все вышесказанное свидетельствует о том, что проблема лечения нарушений костного ремоделирования является актуальной и в связи с нарастающим старением населения все больше актуализируется.

Накопленный опыт медикаментозного лечения дегенеративно-дистрофических заболеваний показывает, что ни один из существующих в настоящее время лекарственных препаратов не может надежно восстановить количество и качество костной ткани [8]. Кроме того, следует учитывать и тот факт, что у пожилых и старых людей, как правило, имеется целый ряд коморбидных состояний и, соответственно, отмечается вынужденная полипрагмазия. Поэтому в последние десятилетия проводится интенсивный поиск возможностей применения для стимуляции остеогенеза не фармакологических, а физических методов: переменного электромагнитного поля высокой и низкой частоты, постоянного электрического тока, ультразвука, имеющих ряд преимуществ при их практическом применении [9—11]. Преимуществами этих методов воздействия являются: безопасность, возможность длительного многофакторного воздействия, отсутствие привыкания.

Опыт лечения некроза головки бедренной кости показал, что внешние электрические сигналы могут

вызывать клеточную реакцию, приводящую к реконструкции поврежденной кости [12—15].

Учитывая результаты многочисленных экспериментальных и клинических исследований свидетельствующих об эффективном действии электростимуляции на различные системы организма и, в частности, на снижение тугоподвижности суставов, спастичности мышц и подавлении болевого синдрома после переломов, ускорение регенерации кости [9, 16—18] был разработан аппарат «Остеон-1» для эффективного восстановления структуры костной ткани [13].

Цель настоящей работы — гистологическое исследование эффективности восстановления костной ткани при стимуляции поврежденной кости животных с помощью прибора «Остеон-1».

Методика

Работа выполнена на 30 крысах-самцах линии Wistar (вес 330 — 360 г, возраст 3,5 мес.). Крысы содержали в стандартных условиях по 5 особей в клетке с контролируемыми режимами температуры (24°C) и освещения (в течение 12 ч) и со свободным доступом к воде и пище. Операцию по моделированию травмы проводили под общим наркозом. Сначала животных анестезировали легким эфирным наркозом. Для более глубокого наркоза использовали хлоралгидрат, внутривенно, в дозе 300 мг/кг. Затем животное фиксировали на операционном столике, состригали шерсть в области левого бедра и скальпелем разрезали кожу и мышечную ткань. Бедренную кость в области тазобедренного сустава обнажали, просверливали бедренную кость до костномозгового канала на 8—10 мм дистальнее сустава с помощью миниатюрной стоматологической борма-

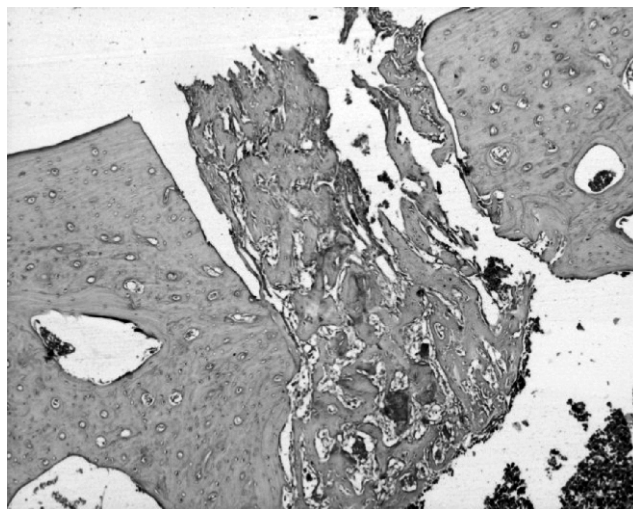


Рис. 1. Контроль 7 суток. Раневой канал заполнен губчатой костью, кровяные клетки отсутствуют. Видна внутренняя костная мозоль.

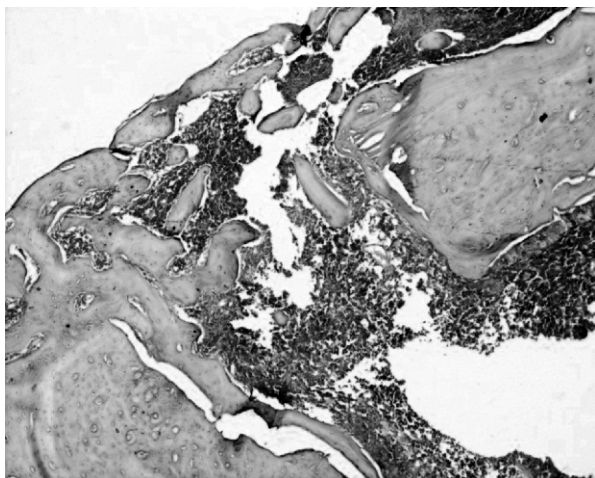


Рис. 2. Контроль 21 сутки. Видны периостальная, эндостальная и интермедиарная костные мозоли. Присутствуют многочисленные кровяные клетки.

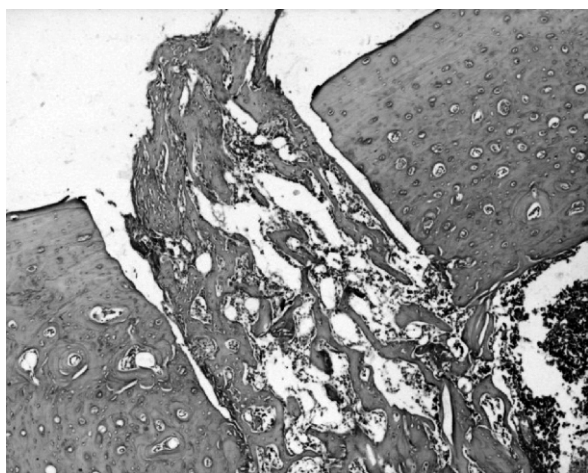


Рис. 3. Опыт 7 суток. Формирование интермедиарной и эндостальной мозолей. Область повреждения заполнена губчатой костью. Между трабекулами новообразованной костной ткани присутствуют кровяные клетки.

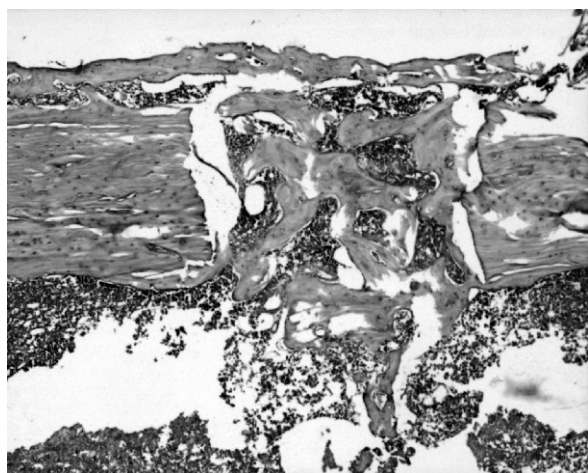


Рис. 4. Опыт 21 сутки. Раневой канал полностью закрыт. Видна мощная периостальная костная мозоль.

шины (диаметр бора 0,8 мм). После повреждения кости производили послойное ушивание мягких тканей. Животных разделяли на две группы. Контрольную (15 крыс) и опытную (15 крыс). У подопытных животных с помощью прибора «Остеон-1» проводили стимуляцию области травмы по 5 мин ежедневно в течение 7 сут. (оп7), 14 сут. (оп14) и 21 сут. (оп21). Для этого животных фиксировали на операционных столиках и через введенные под кожу хирургические иглы подавали смешанный сигнал из двух импульсных напряжений разной скважности, один из которых модулирован более высокой частотой. Сигналы были не синхронизированными относительно друг друга, однополярными с изменяющимися частотами и амплитудами. Катод располагался в области травмы, анод помещался на ту же лапу дистальнее. Электростимуляцию осуществляли под общим наркозом (хлоралгидрат в дозе 190—200 мг/кг, внутривенно).

Три группы животных с нанесенной травмой служили контролем (к7, к14, к21), они также располагались на препаровальных столиках, им вводилась хирургические иглы, но стимуляция не осуществлялась. В каждом варианте опыта использовали по 5 животных. На следующий день по окончании исследований животные выводились из эксперимента путем цервикальной дислокации. Затем извлекали бедренные кости у всех 6 групп, которые использовали для гистологического анализа и оценки выраженности патологического процесса и процесса остеогенеза.

Кости животных фиксировали 24 часа при комнатной температуре в 10% формалине, приготовленном на фосфатно-солевом буфере (ФСБ, 0,02М, рН 7.6). Декальцинировали в 5% трихлоруксусной кислоте 48 часов, затем промывали в ФСБ и замораживали в изопентане при 40°C. Далее приготавливали срезы толщиной 5 мкм. Срезы высушивали при комнатной температуре в течение 1 часа и окрашивали гематоксилин-эозином. Для гистологического анализа от каждого животного было изготовлено от 100 до 200 серийных срезов бедренной кости, сделанных в поперечном и продольном направлениях. С помощью микроскопа Олимпус (ок. 10х, об. 4х) делали микрофотографии срезов костной ткани. Морфометрический анализ костной ткани внутри раневого канала (интермедиарная костная мозоль) осуществляли с помощью программы ImageJ [19]. Площадь костной ткани, измеренной на 3—5 срезах от каждого животного, выражали в процентах от площади канала. Для определения достоверности различий между опытом и контролем использовали непараметрический двусторонний критерий Манна—Уитни (U-тест).

Результаты и обсуждение

Регенерация костной ткани у контрольных животных

Результаты морфологических исследований свидетельствуют что, в группе контрольных животных новая кость образуется в области периоста, эндоста и костномозговой полости на 7 сутки после нанесения травмы (рис. 1). Начало восстановления осуществляется в области периоста через фазу энхондрального окостенения. В этот период в области периоста происходит активная пролиферация клеток и число слоев остеогенных клеток многократно увеличивается, в то же время в надкостнице интактной кости присутствует лишь один слой этих клеток. Область повреждения заполняется молодой губчатой костью (интермедиарная мозоль).

На 14-е сутки между трабекулами интермедиарной мозоли выявляются кроветворные клетки. Внутри полости бедренной кости начинается формирование внутренней (эндостиальной) костной мозоли, характеризующейся выраженным разрастанием молодой губчатой кости с полостями, заполненными рыхлой соединительной тканью и кровеносными сосудами.

В последующий период происходит некоторое замедление процесса регенерации костной ткани. Так, на 21-е сутки после повреждения, по сравнению с 14-суточным периодом наблюдений, существенных изменений в морфологической картине восстановления костной ткани не отмечается, за исключением формирования наружной периостальной мозоли. В костномозговой полости присутствует эндостиальная мозоль, представленная губчатой костью, иногда пронизывающей всю полость диафиза в области повреждения. Наблюдается частичное заполнение области повреждения губчатой костью распространяющейся на поверхность бедренной кости и формирующей наружную костную мозоль. Между трабекулами губчатой кости обнаруживаются многочисленные кроветворные клетки костного мозга (рис. 2).

Регенерация костной ткани у подопытных животных

На 7-е сутки электростимуляции в группе подопытных животных в области повреждения развивается мощная губчатая кость и присутствуют признаки закрытия внешнего отверстия раневого канала костью. В отличие от контроля, в периосте, хондрогенез практически не выражен. В то же время отмечается распространение новообразующейся кости внутри полости кости до ее неповрежденной стенки (эндостиальная мозоль), а интермедиарная мозоль, начинает интегрироваться со старой пластинчатой костью, окружающей повреждение, способствуя укреплению поврежденной кости. В отличие от контрольных животных, уже на 7-е сутки электростимуляции отмечается наличие кроветворных клеток внутри трабе-

кул вновь образованной кости. Как было сказано выше, такой эффект у контрольных животных отмечается только на 14-е сутки. Эти результаты свидетельствуют о большей скорости регенерации по сравнению с костной тканью контрольной группы животных (рис. 3).

К 14-м суткам процесс регенерации активно развивается. Канал повреждения полностью заполняется довольно мощной губчатой костью. В её полостях появляются многочисленные кроветворные клетки. Сформированная кость уже интегрируется со стенкой раневого канала.

На 21-е сутки электростимуляции отмечается укрепление наружных стенок раневого канала новообразованной костной тканью. Наблюдается формирование уже хорошо выраженной, мощной периостальной костной мозоли. Она простирается на значительное расстояние вдоль кости. Это убедительно свидетельствует, что электростимуляция значительно ускоряет ее образование, по сравнению с контролем. На существенную активизацию остеогенеза указывает также формирование нескольких слоев остеобластов в надкостнице (рис. 4).

Полученные результаты морфологического исследования позволяют прийти к заключению о том, что через 21 сут. от момента начала эксперимента в группе контрольных животных отмечается относительно слабое костеобразование внутри канала повреждения, хотя костная мозоль на поверхности кости сформирована, а внутренняя костная мозоль сохраняется. У подопытных животных, в отличие от контрольной группы, наблюдается более интенсивное костеобразование — более мощная наружная мозоль и значительно большая степень закрытия раневого канала.

Как уже было сказано выше, одним из эффективных методов воздействия на регенерацию костной ткани является электрическая и электромагнитная стимуляция.

Регенерация кости в значительной степени зависит от успешного завершения воспалительного процесса, васкуляризации в месте повреждения, секреции остеогенных и хондрогенных факторов, ремоделирования внеклеточного матрикса в поврежденной и вновь образованной костной ткани. Успешное завершение воспалительного процесса, васкуляризация в месте повреждения невозможны без нормализации микроциркуляции. Электростимуляция играет ведущую роль в устранении дисрегуляции микроциркуляторного звена кровообращения как во всем организме, так и в костных тканях. Это системный процесс [17].

Активирующее влияние электрического потенциала на клетки организма обусловлено изменением концентрации ионов по обе стороны клеточной мембраны, что приводит к изменению функционального состояния клетки. Это происходит в результате трансмембранного сигналинга, активации ионных каналов и стимуляции или блокады различных рецепторов [20]. Электрическое или электромагнитное поля способны усиливать

экспрессию генов, синтез ростовых факторов и, в частности факторов, участвующих в энхондральном окостенении, через ауто- и паракринные сигналы. При этом может усиливаться продукция морфогенетического белка кости (МВР), трансформирующего фактора роста (TGF- β), инсулиноподобного фактора (IFGII), что увеличивает продукцию внеклеточного матрикса хряща и кости [21]. *In vitro* показано, что воздействие импульсного электромагнитного поля на культивируемые *in vitro* остеобласты линии MC3T3-E1 стимулирует образование костной ткани, что выражается в повышенной активности щелочной фосфатазы и отложении минерализованного матрикса [22]. На сегодняшний день можно считать доказанным, что интенсивность остеорепарации при электростимуляции обусловлена околоэлектродными электрохимическими, биофизическими и биохимическими реакциями и индуцированными ими общими нейрогуморальными воздействиями на остеогенез.

Наиболее сильное раздражающее действие на биологические системы оказывает импульсный ток, так как импульсные воздействия в определенном заданном ритме соответствуют физиологическим ритмам функционирующих органов и систем [23]. Импульсный ток низкой частоты успешно применяется в ортопедии для стимуляции регенеративных процессов в кости при переломах [11, 24, 25].

Клиническое применение электрического и электромагнитного стимулирования улучшает регенерацию кости на клеточном уровне. Это проявляется во взаимодействии клеток с окружающей средой, воздействии факторов роста и работе системы сигнальной трансдукции [21].

Полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют об эффективности электростимуляции токами низкой частоты, генерируемыми прибором «Остеон-1», для восстановления костной ткани после повреждения. Морфологические исследования показали, что данные параметры электростимуляции ускоряют темп регенерации поврежденной кости, вызывают более выраженную интеграцию новообразованной кости со старой неповрежденной костью и способствуют формированию более мощной периаостальной мозоли по сравнению с контролем.

Список литературы

1. McMichael A.J., McKee M., Shkolnicov V., Valkonen T. Mortality trends and setbacks: global convergence or divergence? *Lancet*. 2004; 363: 1155 — 1159.
2. Turner J.A. Research on cognitive-behavioral therapies for older adults with chronic pain: In its infancy, but growing. *Pain*. 2013; 154: 771 — 772.
3. Щегорцов А.А. Стратегическое планирование качества жизни пожилых граждан. *Вестник Российской ассоциации геронтологов и гериатров*. 2014; 1: 14 — 20.
4. Михайлов Е.Е., Беневоленская Л.И. В кн.: *Руководство по остеопорозу*. Под ред. Л.И. Беневоленской. М: БИНОМ 2003; 10-55.

5. Лесняк О.М. Аудит состояния проблемы остеопороза в Российской Федерации. *Профилактическая медицина*. 2011; 2: 7-10.

6. Руденко Э.В., Буглова А.Е., Руденко Е.В., Самоховец О.Ю. Медикаментозное лечение остеопороза у взрослых. Учебно-методическое пособие, Минск: БелМАПО, 2011. — 22 с.

7. Leveille S.G. Musculoskeletal pain and risk for falls in older disabled women living in the community. *J.Am.Geriatri. Soc.* 2002; 50: 671 — 675.

8. Чернов, Ю.Н., Пешехонова Л.К., Батищева Г.А. Остеопороз: критические звенья патогенеза и пути фармакологической коррекции. В *мире лекарств*. 2000; 2: <http://medi.ru/doc/7200210.htm>

9. Резник Л.Б., Рожков К.Ю., Ерофеев С.А. и др. Применение физических факторов для оптимизации костной регенерации (обзор литературы). *Журнал клинической и экспериментальной ортопедии им. Г.А. Илизарова*. 2015; 1: 89-95.

10. Городниченко А.И., Городецкий И.Г., Решетняк В.К., Турзин П.С., Усков О.Н. Интерактивная электростимуляция в лечении травматолого-ортопедических больных. *Кремлевская медицина. Клинический вестник*. 2005; 4: 76-81.

11. Городниченко А.И., Городецкий И.Г., Решетняк В.К., Турзин П.С., Ушаков И.Б., Усков О.Н. Применение интерактивной электростимуляции у больных с переломами лодыжек в постоперационном периоде. *Профилактическая медицина*. 2009; 12 (1): 38 -41.

12. Волков Е.Е., Кэцинь Хуан, Асептический некроз головки бедренной кости. Безоперационное лечение. — М., ООО «Пиар-пресс». 2010; 128.

13. Волков Е.Е. Возможная альтернатива эндопротезированию тазобедренных суставов при асептическом некрозе головки бедренной кости, Рефлексотерапия и комплементарная медицина. 2013; 3: 26-34.

14. Mahmud F.A., Hastings G.W., Martini M. Model to characterize strain generated potentials in bone. *J.Biomed. Eng.* 1988; 10 (1): 54-56.

15. Huang L.Q., He H.C., He C.Q., et al. Clinical update of pulsed electromagnetic fields on osteoporosis. *J. Orthop. Res.* 2008; 26 (9): 1250-1255.

16. Дуринян Р.А., Решетняк В.К., Зарайская С.М. Нейрофизиологические механизмы иглоукальвания. *Мед. Реф. Журнал*. 1981; 5: 13-20.

17. Решетняк В.К., Кукушкин М.Л., Мейзеров Е.Е. Нейрофизиологическое обоснование параметров электрокупунктурной, электропунктурной и чрезкожной электростимуляции при лечении болевых синдромов. В кн: *Итоги и перспективы развития традиционной медицины в России*. Москва. 2002: 122 — 125.

18. Ткаченко С.С., Руцкий В.В. Электростимуляция остеорепарации. Л.: Медицина. 1989: 207 с.

19. Abramoff M.D., Magelhaes P.J., Ram S.J. Image processing with ImageJ. *Biophoton. Int.* 2004; 11: 36-42.

20. Aaron R.K., Boyan B.D., Ciombor D.M., et al. Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics*. 2004; 25 (2): 134-41.

21. Haddad J.B., Obolensky A.G., Shinnick P. The biologic effects and the therapeutic mechanism of action of electric and electromagnetic field stimulation on bone and cartilage: new findings and a review of earlier work. *Electromagn Biol Med*. 2007; 26 (3): 167-177.

22. Diniz P., Shomura K., Soejima K., Ito G. Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 2002; 49 (1): 33-37.

23. Решетняк В.К. Нейрофизиологические основы боли и рефлекторного обезболивания. В кн: *Итоги науки и техники. Физиол.человека и животных*. Москва. 1985; 29: 39-109.

24. Schwartz Z, Fisher M, Lohmann CH, et al. Osteoprotegerin (OPG) production by cells in the osteoblast lineage is regulated by pulsed electromagnetic fields in cultures grown on calcium phosphate substrates. *Chin. Med. J. (Engl)*. 2008; 121(20): 2095-2099.

25. Chen K., Hao J., Noritake K., et al. Low intensity pulsed ultrasound stimulation (LIPUS) has been clinically applied to promote bone fracture healing in the orthopedic field. *Open Journal of Regenerative Medicine*. 2013; 2 (1): 8-14.

Received 13.05.15

References

1. McMichael A.J., McKee M., Shkolnicov V., Valkonen T. Mortality trends and setbacks: global convergence or divergence? *Lancet*. 2004; 363: 1155 — 1159.

2. Turner J.A. Research on cognitive-behavioral therapies for older adults with chronic pain: In its infancy, but growing. *Pain*. 2013; 154: 771 — 772.

3. Shegortsev A.A. Strategic planning the quality of life of older citizens. *Vestnik Rossijskoy asociacii gerontologov i geriatrov*. 2014; 1: 14 — 20.

4. Mihailov E.E., Benevolenskai L.I. In book: Guide to osteoporosis. Ed: Benevolenskai L.I. M: BINOM 2003; 10-55.

5. Lesnyak O.M. Audit & problems of osteoporosis in the Russian Federation. *Profilakticheskai medicina*. 2011; 2: 7-10.

6. Rudenko A.V., Buglova A.E., Rudenko E.V., Samohovets O.U. Drug treatment of osteoporosis in adults. *Textbook*. Minsk: BelMAPO, 2011 — 22 c.

7. Leveille S.G. Musculoskeletal pain and risk for falls in older disabled women living in the community. *J.Am.Geriatr. Soc.* 2002; 50: 671 — 675.

8. Chernov U.N., Pechehonova L.K., Baticheva G.A. Osteoporosis: a critical pathogenesis and ways of pharmacological correction. *V mire lekarstv*. 2000; 2: <http://medi.ru/doc/7200210.htm>

9. Reznik L.B., Rochkov K.U., Erofeev C.A. et al. The application of physical factors for the optimization of bone regeneration (literature review). *Jurnal klinicheskoi i eksperimentalnoy ortopedii of name G.A. Ilizarova*. 2015; 1: 89-95.

10. Gorodnichenko A.I., Gorodeckiy I.G., Rechetniak V.K., Turzin P.S., Uskov O.N. Interactive electrical stimulation in the treatment of trauma and orthopedic patients. *Kremlevskai medicina. Clinicheskii vestnik*. 2005; 4: 76-81.

11. Gorodnichenko A.I., Gorodeckiy I.G., Rechetniak V.K., Turzin P.S., Uchakov I.B., Uskov O.N. The interactive application of electrical stimulation in patients with fractures of the ankles in the postoperative period. *Profilakticheskai medicina*. 2009; 12 (1): 38 -41.

12. Volkov E.E., Kecin Huan. Aseptic necrosis of the femoral head. Non-surgical treatment. — M., ООО «Pir-press». 2010; 128.

13. Volkov E.E. A possible alternative to hip replacement in avascular necrosis of the femoral head. *Refleksoterapia i komplementarnai medicina*. 2013; 3: 26-34.

14. Mahmud F.A., Hastings G.W., Martini M. Model to characterize strain generated potentials in bone. *J.Biomed. Eng.* 1988; 10 (1): 54-56.

15. Huang L.Q., He H.C., He C.Q., et al. Clinical update of pulsed electromagnetic fields on osteoporosis. *J. Orthop. Res.* 2008; 26 (9): 1250-1255.

16. Durinian R.A., Rechetniak V.K., Zaraiskai S.M. Neurophysiological mechanisms of acupuncture. *Med. Ref. J.* 1981; 5: 13-20.

17. Rechetniak V.K., Kukuchkin M.L., Meizerov E.E. Neurophysiologic basis of parameters electroacupuncture, electroacupuncture and transcutaneous electrical stimulation in the treatment of pain syndromes. *V knige: Itogi i perspektivi razvitiya tradicionnoi medicini v Rosii*. Moskva. 2002: 122 — 125.

18. Tkachenko S.S., Ruckii V.V. Electrical stimulation osteoreparation. L.: *Medicina*. 1989: 207 p.

19. Abramoff M.D., Magelhaes P.J., Ram S.J. Image processing with ImageJ. *Biophoton. Int.* 2004; 11: 36-42.

20. Aaron R.K., Boyan B.D., Ciombor D.M., et al. Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics*. 2004; 25 (2): 134-41.

21. Haddad J.B., Obolensky A.G., Shinnick P. The biologic effects and the therapeutic mechanism of action of electric and electromagnetic field stimulation on bone and cartilage: new findings and a review of earlier work. *Electromagn Biol Med.* 2007; 26 (3): 167-177.

22. Diniz P., Shomura K., Soejima K., Ito G. Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 2002; 49 (1): 33-37.

23. Rechetniak V.K., Neurophysiological bases of pain and reflex analgesy. *V knige: Itogi nauki i tehniki. Physiol. Cheloveka i chivotnich. Moskva*. 1985; 29: 39-109.

24. Schwartz Z, Fisher M, Lohmann CH, et al. Osteoprotegerin (OPG) production by cells in the osteoblast lineage is regulated by pulsed electromagnetic fields in cultures grown on calcium phosphate substrates. *Chin. Med. J. (Engl)*. 2008; 121(20): 2095-2099.

25. Chen K., Hao J., Noritake K., et al. Low intensity pulsed ultrasound stimulation (LIPUS) has been clinically applied to promote bone fracture healing in the orthopedic field. *Open Journal of Regenerative Medicine*. 2013; 2 (1): 8-14.

Received 13.05.15

Сведения об авторах:

Волков Евгений Егорович — зав. отделением традиционной медицины Клиники преморбидных и неотложных состояний ФКУ «МУНКЦ» им. П.В. Мандрыка МО РФ, главный врач ООО «Медицинский центр ХуанДи», канд. мед. наук

Кучеряну Валериан Григорьевич — главный научный сотрудник лаборатории общей патологии нервной системы ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии, доктор мед. наук

Домазрацкая Елена Ивановна — зав. лабораторией клеточных и молекулярных основ гистогенеза ФГБНУ Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, доктор биол. наук

Паюшина Ольга Викторовна — старший научный сотрудник лаборатории клеточных и молекулярных основ гистогенеза ФГБНУ Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, канд. биол. наук

Буторина Нина Николаевна — старший научный сотрудник лаборатории клеточных и молекулярных основ гистогенеза ФГБНУ Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, канд. биол. наук

Волков Андрей Евгеньевич — сотрудник ООО «Медицинский центр ХуанДи»

Никифоров Н.Г.^{1,2,3}, Makeev В.Ю.⁴, Елизова Н.В.^{1,3}, Орехов А.Н.^{1,3}

Активируемость моноцитов человека при атеросклерозе

¹ — «Научно-исследовательский институт атеросклероза», «Инновационный центр Сколково», 143025, Сколково, Московская область, Россия, ул. Новая, д. 100

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

³ — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

⁴ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова», 119991, Москва, ул. Губкина, д. 3

Моноциты были выделены из крови пациентов, относящихся к трем группам: лица с нормальной толщиной интима-медиа-слоя (ТИМС) сонных артерий, пациенты с увеличенной ТИМС и пациенты с атеросклеротическими бляшками. Степень активации макрофагов определялась концентрацией в культуральной среде цитокина ФНО- α и хемокина CCL18 соответственно. При сравнении средних значений концентраций ФНО- α и CCL18 для пациентов всех групп были выявлены индивидуальные различия. Эти индивидуальные различия были обнаружены как в пределах каждой из групп, так и во всей выборке. Обнаружена обратная связь между внутриклеточным уровнем холестерина и способностью моноцитов к активации. Чтобы выявить причину этой связи, моноциты культивировали с атерогенными модифицированными липопротеидами низкой плотности, вызывающими накопление холестерина в культивируемых клетках. Накопление внутриклеточного холестерина не оказывало влияния ни на секрецию цитокинов, ни на экспрессию соответствующих генов. Следовательно, индивидуальные различия в активируемости моноцитов не определяются накоплением внутриклеточного холестерина, вызванного атерогенными липопротеидами. Полученные данные можно объяснить индивидуальными особенностями иммунного ответа у различных пациентов.

Ключевые слова: атеросклероз; макрофаги; моноциты; активация; воспаление; липопротеиды; липиды; индивидуальный профиль

Nikiforov N.G.^{1,2,3}, Makeev V.J.⁴, Elizova N.V.^{1,3}, Orekhov A.N.^{1,3}

Ability of human monocytes to activate in atherosclerosis

¹ — Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Centre, 143025, Skolkovo, Moscow Region, Russia, Novaya street, 100

² — 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

³ — Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia 125315, Moscow, Baltiyskaya street, 8

⁴ — Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russia, 119991, Moscow, Gubkina street, 3

Monocytes were isolated from blood of patients belonging to three groups: those with normal intima-media thickness (IMT) of carotid arteries, patients with increased IMT and patients with atherosclerotic plaques. The degree of activation of the macrophages was determined by the concentration of the cytokine TNF- α and chemokine CCL18 in the culture medium. When comparing the average values of the concentrations of TNF- α and CCL18 for patients in all groups dramatic individual differences were revealed. These individual differences were found within each group and in the pool. An inverse relationship between intracellular cholesterol levels and the ability of monocytes to activate was found. To clarify the cause of this relationship, monocytes were cultured with atherogenic modified low-density lipoprotein, causing accumulation of cholesterol in cultured cells. The accumulation of intracellular cholesterol had no effect neither on the secretion of cytokines nor on the expression of their genes. Therefore, individual differences in the activation capacity of monocytes is not determined by the accumulation of intracellular cholesterol caused by atherogenic lipoproteins. The data obtained can be explained by the individual characteristics of the immune response in different patients.

Key words: atherosclerosis; macrophage; monocyte; activation; inflammation; lipoproteins; lipids; individual profile

Моноциты и макрофаги являются важными клеточными элементами врожденного иммунитета, участвующими в атерогенезе [1, 2]. Несмотря на то, что в развитии атеросклероза участвует много типов клеток, моноциты-макрофаги играют ключевую роль [2—4]. Инфильтрация моноцитов в сосудистую стенку является ранним этапом атерогенеза. При этом моноциты прикрепляются к клеткам эндотелия, мигрируют в субэндотелиальное пространство (интиму) и дифференцируются в макрофаги [4, 5].

Классически активированные макрофаги (субпопуляция M1) могут быть получены путем стимуляции моноцитов липополисахаридом (ЛПС), а также воспалительным цитокином интерфероном- γ (ИФН- γ) или фактором некроза опухоли- α (ФНО- α). Их противовоспалительными коллегами являются альтернативно активированные макрофаги (субпопуляция M2). Фенотип M2 индуцируется интерлейкином (ИЛ)-4 и ИЛ-13, также M2 макрофаги экспрессируют рецептор маннозы (MR / CD206), ложный рецептор ИЛ-1R II и ИЛ-1. Маркерами M1 активации являются ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-12, ИЛ-23, хемокины CXCL9, CXCL10, CXCL11 [3, 6].

Оценивалась восприимчивость моноцитов, циркулирующих в крови здоровых лиц и пациентов с бессимптомным атеросклерозом сонных артерий, к M1 и M2 активации. Удивительно, но мы обнаружили резкие индивидуальные различия в степени активации моноцитов у различных пациентов, причем вне зависимости от наличия или отсутствия атеросклероза. Мы считаем, что полученные результаты очень важны, т.к. выявленные различия можно объяснить индивидуальными особенностями иммунного ответа у различных пациентов. Мы бы хотели представить результаты для широкого обсуждения.

Методика

Проведено кросс-секционное клиническое исследование, в котором приняли участие здоровые лица, условно здоровые люди с предрасположенностью к атеросклерозу, а также лица с доклиническим атеросклерозом. Участники исследования не имели клинических проявлений заболеваний атеросклеротического генеза (ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда в анамнезе, инсульт в анамнезе), не принимали кардиотропные и липидснижающие лекарственные средства, а также не имели сопутствующих хронических заболеваний, способных повлиять на результаты исследования (сахарный диабет, онкопатология, диффузные заболевания соединительной ткани, бронхиальная астма, эндокринные заболевания). Количественная диагностика преатеросклеротических и атеросклеротических состояний осуществлялась с помощью ультразвукового сканирования бассейна сонных артерий в режиме высокого разре-

шения с последующим измерением толщины интимо-медиального слоя (ТИМС) общих сонных артерий с использованием специализированного программного пакета M'Ath (ИМТ, Франция). Для оценки степени развития бессимптомного атеросклероза использовались имеющиеся данные о вариабельности ТИМС у условно здоровых лиц в российской популяции. Принадлежность к первой и второй квартилям распределения ТИМС при отсутствии возвышающихся поражений в любом из визуализируемых отделов бассейна сонных артерий расценивалась как норма (здоровые лица). Принадлежность к четвертой квартили распределения ТИМС при отсутствии возвышающихся поражений в любом из визуализируемых отделов бассейна сонных артерий расценивалась как предрасположенность к атеросклерозу. Принадлежность к третьей и четвертой квартилям распределения ТИМС при наличии возвышающихся поражений (более 10% просвета артерии) хотя бы в одном из визуализируемых отделов бассейна сонных артерий расценивалась как доклинический (бессимптомный) атеросклероз.

Для определения индивидуального профиля активации клеток, моноциты выделяли из цельной венозной крови с использованием магнитной сепарации CD14+ клеток (Miltenyi Biotec), которая обеспечивала высокую чистоту популяции клеток. Моноциты культивировали в стерильных 24-луночных планшетах в количестве 10^6 клеток на лунку с использованием бессывороточной среды X-Vivo (Lonza). Клетки культивировали при 37°C и 5% CO $_2$ в CO $_2$ -инкубаторе.

Функциональный анализ активации моноцитов заключался в измерении концентраций цитокинов, секретруемых клетками в стандартизированных условиях в ответ на провоспалительную стимуляцию ИФН- γ в концентрации 100 нг/мл или противовоспалительную стимуляцию 10 нг/мл ИЛ-4. Секреция ФНО- α рассматривалась как маркер провоспалительной активации моноцитов, а секреция CCL18 — как маркер противовоспалительной активации. Концентрации ФНО- α и CCL18 в культуральной среде измерялись твердофазным иммуно-ферментным анализом через 1 и 6 дней после стимуляции моноцитов соответственно.

Выделение ЛНП осуществлялось путем ультрацентрифугирования сыворотки крови и получения фракции плотностью от 1,019 до 1,065 г/мл.

Содержание внутриклеточного холестерина измеряли путем экстракции липидов из клеток в смеси гексана и изопропанола (отношение объемов 3:2), после чего концентрацию холестерина в экстракте измеряли ферментативно с использованием наборов Fluid-test CHOL (Analyticon).

Статистический анализ результатов проводили с использованием программы IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM).

Результаты и обсуждение

Моноциты были выделены из крови пациентов, относящихся к трем группам: люди с нормальной ТИМС, пациенты с увеличенной ТИМС и пациенты с атеросклеротическими бляшками. Степень активации М1 и М2 макрофагов определялась концентрацией в культуральной среде ФНО- α и ССЛ18 соответственно.

При сравнении средних значений концентраций ФНО- α и ССЛ18 для пациентов всех групп мы столкнулись разительными индивидуальными различиями. Эти индивидуальные различия были обнаружены как в пределах каждой из групп, так и во всей выборке. График Q-Q для всей выборки показывает, что индивидуальная восприимчивость моноцитов к активации варьирует, особенно для ССЛ18 (рис. 1). Если данные для ФНО- α имеют характер нормального распределения с относительно небольшим количеством выпадающих точек, соответствующих высоким значениям секреции ФНО- α , то распределение концентраций ССЛ18 можно считать нормальным в гораздо меньшей степени. Распределения внутри каждой из групп соответствуют распределению во всей выборке (данные не представлены).

Моноциты в раннем атеросклеротическом поражении могут мигрировать обратно в кровоток, возможно, выполняя функции обратного транспорта липидов [7]. Мы наряду с другими исследователями обнаружили в крови клетки, содержащие липиды [8—10]. У больных атеросклерозом было обнаружено две субпопуляции белых кровяных клеток. Первая популяция клеток содержала нормальное количество липидов, характерное для здоровых испытуемых, в то время как вторая популяция содержала в 4—8 раз больше внутриклеточных липидов [10]. Мы попытались найти взаимосвязь между количеством внутриклеточного холестерина в моноцитах и их способностью к активации.

Наблюдалась обратная связь между внутриклеточным уровнем холестерина и способностью моноцитов к активации, однако, коэффициенты корреляции не достигли статистической значимости (таблица).

Для того, чтобы выявить причину взаимосвязи между уровнем внутриклеточного холестерина моноцитов и их способностью к активации, были проведены эксперименты на первичной культуре моноцитов, культивируемых с атерогенными модифицированными липопротеидами низкой плотности (ЛНП). Как правило, ЛНП, выделенные из крови больных с документированным атеросклерозом, вызывают накопление холестерина в культивируемых клетках, в то время как ЛНП от здоровых доноров не влияют на уровень внутриклеточного холестерина [11—14]. Несмотря на то, что модифицированные ЛНП вызывали накопление холестерина в культивируемых моноцитах, они не оказывали влияния ни на секрецию цитокинов, ни на экспрессию соответствующих генов (рис. 2).

Таким образом, индивидуальные различия активированности моноцитов не определяются накоплением внутриклеточного холестерина, вызванного атерогенными модифицированными ЛНП. Поиск причин этих различий имеет огромное значение, поскольку таким образом можно выявить факторы, определяющие иммунный статус пациента.

Развитие данного направления исследования имеет практическую перспективу. Используемый в данной работе клеточный тест для оценки активированности моноцитов может стать основой для разработки и создания диагностического метода определения индивидуальной реакции врожденного иммунитета. Разумеется, эта клеточная модель может быть использована для широкого изучения ответа клеточного иммунитета на различные стимулы.

Было исследовано содержание холестерина в моноцитах, выделенных из крови испытуемых, разделенных на 3 группы в зависимости от выраженности атеросклероза в сонной артерии. Во время посева клеток в культуру добавляли ИФН- γ или ИЛ-4 в культуральную среду. Концентрацию ФНО- α в культуральной среде определяли через 24 часа после добавления в среду ИФН- γ , а ССЛ18 — через 6 дней после добавления ИЛ-4. Коэффициенты корреляции между содержанием внутриклеточного холестерина в моноцитах и их способностью к активации определяли по Пирсону. Значения P приведены в скобках.

Таблица

Коэффициенты корреляции между содержанием внутриклеточного холестерина в моноцитах и их способностью к активации

Группа пациентов	ФНО- α , базальная секреция	ФНО- α , стимулированная секреция	ФНО- α , стимулированная/ базальная секреция	ССЛ18, стимулированная секреция
1 (n = 38)	0,061 (0,718)	0,125 (0,455)	0,145 (0,385)	0,046 (0,785)
2 (n = 34)	0,236 (0,179)	0,057 (0,748)	0,148 (0,404)	0,058 (0,746)
3 (n = 29)	0,173 (0,369)	0,035 (0,858)	0,158 (0,412)	0,179 (0,353)
Всего (n = 101)	0,064 (0,528)	0,052 (0,609)	0,105 (0,295)	0,019 (0,849)

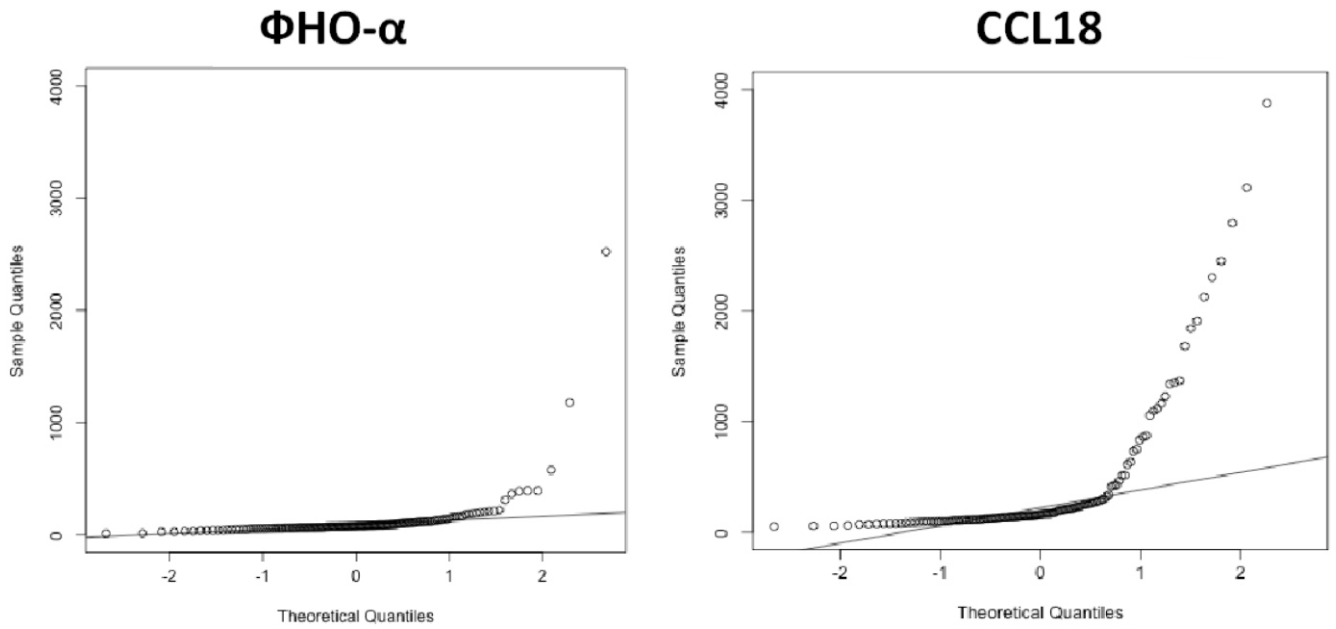


Рис. 1. График Q-Q для активируемости моноцитов.

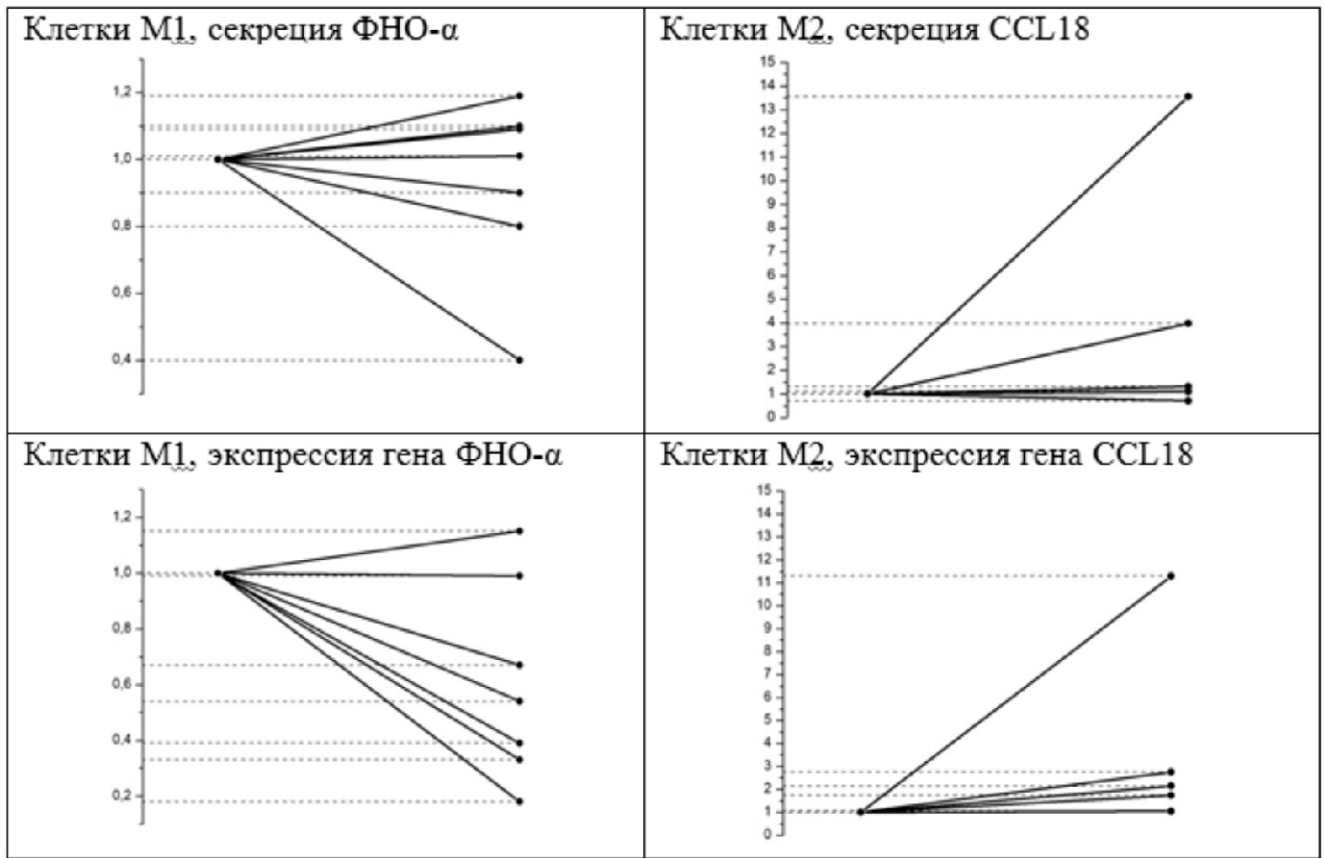


Рис. 2. Инкубация моноцитов с атерогенными модифицированными ЛНП.

Во время посева клеток в культуру добавляли ИФН- γ или ИЛ-4 в культуральную среду. Концентрацию ФНО- α в культуральной среде определяли через 24 часа после добавления в среду ИФН- γ , а ССЛ18 — через 6 дней после добавления ИЛ-4. Атерогенные модифицированные ЛНП были выделены из крови пациентов с документированным атеросклерозом. Нативные ЛНП были выделены из крови здоровых доноров. Нативные ЛНП не вызывали накопления внутриклеточного холестерина в культивируемых моноцитах, в то время как атерогенные ЛНП вызывали 1,7–2,0 кратное увеличение содержания внутриклеточного холестерина. Нативные, либо модифицированные ЛНП добавлялись в культуру моноцитов непосредственно после их выделения. Для оценки эффекта модифицированных ЛНП в каждом эксперименте каждый параметр в случае добавления нативных ЛНП был принят за 1,0. Графики отражают данные отдельных экспериментов, проведенных на моноцитах, выделенных из крови различных испытуемых.

Работа проведена при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Министерства образования и науки России (проект RFMEF161614X0021).

Список литературы

1. Ажунова ТА, Николаев СМ, Буряева ЛБ, Дашев ДБ, Банзаракшеева СА. Гиполипидемия, антиоксидантное и антикоагулянтное действие соединения камфора-25. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2009; 2: 16–9.
2. Libby P, Ridker PM, Hansson GK; Leducq Transatlantic Network on Atherothrombosis. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol.* 2009; Dec 1;54 (23): 2129–38.
3. Гервазиева ВБ, Самоіликов ПВ, Сверановскаиа ВВ. IgE-аутоантитела у больных с атопическим дерматитом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2009; 1: 19–22.
4. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; Sep; 32(9): 2045–51.
5. Федоров ВН, Пынегова НВ. Влияние ecdysterone-80 на посредника гормонального баланса и липидного обмена у крыс с хронической сердечной недостаточностью. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2009; 2:14–6.
6. De Paoli F, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. Macrophage phenotypes and their modulation in atherosclerosis. *Circ J.* 2014; 78(8): 1775–81.
7. Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis: II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1981; 103(2): 191–200.
8. Gaudreault N, Kumar N, Posada JM, Stephens KB, Reyes de Mochel NS, Eberle D, Olivas VR, Kim RY, Harms MJ, Johnson S, Messina LM, Rapp JH, Raffai RL. ApoE suppresses atherosclerosis by reducing lipid accumulation in circulating monocytes and the expression of inflam-

matory molecules on monocytes and vascular endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; Feb;32(2): 264–72.

9. Querfeld U, Wendtland J, von Hodenberg E, Mehls O. Lipid levels in monocytes of patients with moderate hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis.* 1992; Jun; 94(2-3): 129–34.

10. Tertov VV, Kalenich OS, Orekhov AN. Lipid-laden white blood cells in the circulation of patients with coronary heart disease. *Experimental and Molecular Pathology.* 1992; 57(1): 22–8.

11. Orekhov AN, Bobryshev YV, Sobenin IA, Melnicenko AA, Chistiakov DA. Modified low density lipoprotein and lipoprotein-containing circulating immune complexes as diagnostic and prognostic biomarkers of atherosclerosis and type 1 diabetes macrovascular disease. *International Journal of Molecular Sciences.* 2014; 15(7): 12807–41.

12. Orekhov AN, Tertov VV, Mukhin DN. Desialylated low density lipoprotein — naturally occurring modified lipoprotein with atherogenic potency. *Atherosclerosis.* 1991; 86(2): 153–61.

13. Tertov VV, Bittolo-Bon G, Sobenin IA, Cazzolato G, Orekhov AN, Avogaro P. Naturally occurring modified low density lipoproteins are similar if not identical: more electro-negative and desialylated lipoprotein subfractions. *Experimental and Molecular Pathology.* 1995; 62(3): 166–72.

14. Tertov VV, Sobenin IA, Tonevitsky AG, Orekhov AN, Smirnov VN. Isolation of atherogenic modified (desialylated) low density lipoprotein from blood of atherosclerotic patients: separation from native lipoprotein by affinity chromatography. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1990; 167(3): 1122–7.

Поступила 24.02.15

References

1. Azhunova TA, Nikolaev SM, Buraeva LB, Dashiev DB, Banzaraksheeva SA. Hypolipidemic, anti-oxidant and anticoagulant action of camphor-25 compound. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2009; 2: 16–9. PubMed PMID: 19537335. (in Russian)
2. Libby P, Ridker PM, Hansson GK; Leducq Transatlantic Network on Atherothrombosis. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 1;54(23): 2129–38.
3. Gervazieva VB, Samoіlikov PV, Sveranovskaia VV. IgE-autoantibodies in patients with atopic dermatitis. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2009;(1):19–22. PubMed PMID: 19382619. (in Russian)
4. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; Sep;32(9):2045–51.
5. Fedorov VN, Pynegovna NV. Influence of ecdysterone-80 on the hormonal-mediator balance and lipid metabolism in rats with chronic cardiac failure. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2009 ; 2:14–6. PubMed PMID: 19537334. (in Russian)
6. De Paoli F, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. Macrophage phenotypes and their modulation in atherosclerosis. *Circ J.* 2014; 78(8): 1775–81.
7. Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis: II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1981; 103(2): 191–200.
8. Gaudreault N, Kumar N, Posada JM, Stephens KB, Reyes de Mochel NS, Eberle D, Olivas VR, Kim RY, Harms MJ, Johnson S, Messina LM, Rapp JH, Raffai RL. ApoE suppresses atherosclerosis by reducing lipid accumula-

tion in circulating monocytes and the expression of inflammatory molecules on monocytes and vascular endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32(2): 264-72.

9. Querfeld U, Wendtland J, von Hodenberg E, Mehls O. Lipid levels in monocytes of patients with moderate hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis.* 1992; 94(2-3): 129-34.

10. Tertov VV, Kalenich OS, Orekhov AN. Lipid-laden white blood cells in the circulation of patients with coronary heart disease. *Experimental and Molecular Pathology.* 1992; 57(1): 22-8.

11. Orekhov AN, Bobryshev YV, Sobenin IA, Melnicenko AA, Chistiakov DA. Modified low density lipoprotein and lipoprotein-containing circulating immune complexes as diagnostic and prognostic biomarkers of atherosclerosis and type 1 diabetes macrovascular disease. *International Journal of Molecular Sciences.* 2014; 21; 15(7): 12807-41.

12. Orekhov AN, Tertov VV, Mukhin DN. Desialylated low density lipoprotein — naturally occurring modified li-

poprotein with atherogenic potency. *Atherosclerosis.* 1991; 86(2): 153-61.

13. Tertov VV, Bittolo-Bon G, Sobenin IA, Cazzolato G, Orekhov AN, Avogaro P. Naturally occurring modified low density lipoproteins are similar if not identical: more electronegative and desialylated lipoprotein subfractions. *Experimental and Molecular Pathology.* 1995; 62(3): 166-72.

14. Tertov VV, Sobenin IA, Tonevitsky AG, Orekhov AN, Smirnov VN. Isolation of atherogenic modified (desialylated) low density lipoprotein from blood of atherosclerotic patients: separation from native lipoprotein by affinity chromatography. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1990; 167(3): 1122-7.

Received 24.02.15

Сведения об авторах:

Макеев Всеволод Юрьевич, доктор ф.-м.н., зав. лаб. системной биологии и вычислительной генетики

Елизова Наталья Владимировна, аспирант Федерального государственного бюджетного учреждения «НИИ общей патологии и патофизиологии»

Орехов Александр Николаевич, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. ангиопатологии ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

Зорин В.Л.^{1,2}, Зорина А.И.², Пулин А.А.¹, Копнин П.Б.³, Еремин И.И.¹

Перспективы использования стволовых клеток, обладающих миогенным потенциалом, в лечении заболеваний скелетных мышц: обзор исследований. Ч. 2. Популяции стволовых клеток мышечного и немышечного происхождения

¹ — ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 123182, Москва, ул. Живописная, д. 46

² — ОАО Институт стволовых клеток человека, 119333, Москва, ул. Губкина, д. 3, стр. 2

³ — НИИ Канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАН, 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24

В статье дан обзор представленных в литературе исследований, посвященных изучению миогенного потенциала, характерных свойств, функций и фенотипических особенностей ряда популяций стволовых клеток мышечного и немышечного происхождения, их способности участвовать в восстановлении физиологического гомеостаза скелетных мышц. Результаты научных изысканий позволяют с высокой степенью вероятности прогнозировать создание эффективной клеточной технологии лечения мышечных дистрофических заболеваний.

Ключевые слова: мышечные дистрофии; клеточная терапия; стволовые клетки; клетки побочной популяции; мезоангиобласты; мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; мышечные стволовые клетки с миогенным потенциалом; стволовые клетки немышечного происхождения с миогенным потенциалом

Zorin V.L.^{1,2}, Zorina A.I.², Pulin A.A.¹, Kopnin P.B.³, Eremin I.I.¹

Prospects for the Use of Cells Possessing Myogenic Potential in the Treatment of Skeletal Muscle Diseases: a Review of Research. Part 2 — Populations of stem cells of muscle and non-muscle origin

¹ — A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center FMBA of Russia, 46 Zhivopisnaya Str., Moscow, 123182, Russia

² — Human Stem Cells Institute, 3/2 Gubkina Str., Moscow, 119333, Russia

³ — N.N. Blokhin Cancer Research Center of RAMS, 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

The paper reviews research results of myogenic potential, specific properties, functions, and phenotypic features of a number of stem cells populations of muscle and non-muscle origin, their ability to participate in the restoration of the physiological homeostasis of skeletal muscle. The results of scientific research allow to predict with high probability the establishment of an effective cell technology to treat degenerative muscle diseases.

Keywords: muscular dystrophy; cell therapy; stem cells; side population cells; mesoangioblasts; multipotent mesenchymal stromal cells; muscle stem cells with myogenic potential; stem cells of non-muscle origin with myogenic potential

Регенераторный потенциал скелетных мышц, как и большинства постнатальных тканей, поддерживается пулом взрослых резидентных стволовых клеток. За проявление этого потенциала главным образом отвечают сателлитные клетки (СК), расположенные между базальной пластиной и плазмолеммой миофибрилл [1, 2, 3]. В течение нескольких лет после откры-

тия СК их рассматривали как единственную клеточную популяцию, обеспечивающую рост и поддержание физиологического гомеостаза скелетных мышц. Однако прогресс в области клеточной биологии позволил выделить другие популяции стволовых клеток, как мышечного, так и немышечного происхождения, способные активно участвовать в миогенезе [4, 5].

В исследованиях было показано, что в самих скелетных мышцах миогенным потенциалом обладают не только СК, но и другие взрослые клетки-предшественники: мультипотентные стволовые мышечные клетки (MDSCs), стволовые мышечные клетки по-

Для корреспонденции: Еремин Илья Игоревич, канд. мед. наук, руководитель Центра биомедицинских технологий ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, e-mail: cd105@mail.ru

бочной популяции (SMSP) и клетки-предшественники CD133+. Наряду с ними был описан и ряд немышечных стволовых клеток взрослого организма с миогенным потенциалом: стволовые клетки, выделенные из костного мозга (ММСК_{км}); клетки-предшественники CD133+, выделенные из крови; мезоангиобласты; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSCs).

Идентификация популяции стволовых клеток с наибольшей способностью к восстановлению утраченной структуры и функций скелетной мышечной ткани критически важна для дальнейшего развития методов клеточной терапии различных патологий скелетных мышц. Решению этой задачи посвящен целый ряд научных исследований в области клеточной, геной и молекулярной биологии и медицины [1, 6, 7].

Цель обзора — анализ на основе литературных данных характерных свойств, функций и фенотипических особенностей нескольких популяций стволовых клеток мышечного и немышечного происхождения, обладающих миогенным потенциалом, а также возможности применения таких клеток в целях восстановления структуры и функций скелетных мышц.

Стволовые клетки мышечного происхождения, обладающие миогенным потенциалом

Мультипотентные мышечные стволовые клетки — MDSCs

MDSCs (Muscle-Derived Stem Cells) — популяция стволовых клеток скелетной мышечной ткани, которые характеризуются фенотипом Sca-1⁺CD34⁺/-c-kit⁻CD45⁻. Они обладают способностью к самоподдержанию, высоким пролиферативным и мультипотентным дифференцировочным потенциалами, прежде всего способностью дифференцироваться в миогенном направлении, обеспечивают восстановление экспрессии дистрофина в мышечных волокнах [8—13]. Так, в исследовании Y. Torrente и соавт. (2001) выделенная ими из скелетных мышц mdx мышей субпопуляция MDSCs (с фенотипом Sca-1⁺CD34⁺/-) после внутриартериальной трансплантации мигрировала из кровотока в скелетную мышечную ткань, где активизировала экспрессию дистрофина [8].

Z. Qu-Petersen и соавт. (2002) установили, что по своим характеристикам MDSCs ассоциированы с некоммитированными миогенными клетками-предшественниками. Авторы выделили из скелетных мышц здоровых мышей и описали субпопуляцию MDSCs (с фенотипом Sca-1⁺CD34⁺/- Vcl2⁺c-kit⁻CD45⁻desmin^{-/+}m-cadherin⁻). Эти клетки показали высокую способность к самоподдержанию (сохраняли свой фенотип после 30 пассажей культивирования) и к пролиферации

(выдерживали более 30 пассажей, не меняя кариотипа) как *in vitro*, так и *in vivo*. Они проявляли мультипотентный дифференцировочный потенциал *in vivo* (дифференцировались в миогенном, нейрогенном и эндотелиальном направлениях), после трансплантации mdx мышцам вызывали длительную экспрессию дистрофина в их скелетных мышцах [12].

В этой же работе была отмечена значительная разница между MDSCs и СК по экспрессии транскрипционных факторов и по способности дифференцироваться в миогенном направлении, причем последняя была у MDSCs значительно выше, чем у СК, как *in vitro*, так и *in vivo* [12]. Сравнение трансплантированных MDSCs и СК по жизнеспособности показало, что MDSCs обладают более высокой выживаемостью в мышцах: спустя 30 и 90 сут. после трансплантации равного количества MDSC и СК mdx мышцам регенераторный потенциал MDSC был в 10 раз выше, чем у СК. Этот факт, вероятно, связан с различным проявлением иммуногенных свойств исследуемых клеточных популяций: в исследовании авторы наблюдали значительно большую экспрессию антигена гистосовместимости MHC-1 на поверхности СК (63%) по сравнению с таковой на поверхности MDSCs (0,5%). Авторы пришли к выводу, что MDSCs и СК являются разными клеточными популяциями, взаимосвязь которых остается до конца не изученной [12].

Позднее, в 2011 г., K. Rouger и соавт. исследовали миогенный потенциал MDSCs и их связь с СК на другой субпопуляции MDSCs, выделенной ими из мышц здоровых собак и названной MuStem-cells (Muscle Stem cells). Эта субпопуляция фенотипически (Pax7⁺CD56⁺b-integrin⁺Myf5⁺MyoD⁺) соответствует ранним некоммитированным миогенным клеткам-предшественникам. MuStem-cells проявляли высокий пролиферативный и дифференцировочный потенциал *in vitro*. Авторами было выявлено, что внутриартериальная трансплантация MuStem-cells иммуносупрессивным собакам с мышечной дистрофией (GRMD) приводила к регенерации мышечных волокон и долговременной экспрессии в них дистрофина, а также к восстановлению пула СК и увеличению физической активности животных [13].

Перспективность применения MDSCs в клеточной терапии мышечных заболеваний обусловлена их высокой способностью к самоподдержанию, пролиферации и дифференцировке в миогенном направлении, к долговременной экспрессии дистрофина в поврежденных мышцах, а также высокой приживаемостью после трансплантации [12]. Важно также, что все выделенные из скелетных мышц субпопуляции MDSCs отличаются способностью мигрировать из кровотока в скелетные мышцы дистрофичных живот-

ных после системного введения. При этом в поврежденных мышцах обнаруживается более высокая концентрация этих стволовых клеток по сравнению с неповрежденной мышечной тканью [13-16].

Культированные MDSCs обладают мультипотентным дифференцировочным потенциалом: они не только спонтанно преобразуются в миотубы, но при соответствующей индукции могут дифференцироваться в остеобласты [17], хондробласты [18], гемопоэтические [19] и эндотелиальные клетки [6]. Некоторые субпопуляции MDSCs наряду с миогенными обладают кардио- и нейрогенными потенциальными [9, 20]. Таким образом, MDSCs можно использовать в качестве альтернативного источника плюрипотентных стволовых клеток при разработке клеточных препаратов, показанных к применению в различных областях регенеративной медицины.

Мышечные стволовые клетки побочной популяции — SMSP

Побочную популяцию (SP — Side Population) стволовых клеток взрослого организма первоначально идентифицировали среди клеток костного мозга, но в более поздних исследованиях они были выявлены и в других тканях [21]. Для SP-клеток характерны высокий уровень экспрессии ABCG2 и «невключение» витального красителя Hoechst 33342, с помощью которого осуществляют их сортировку [21, 22]. (ABCG2 — АТФ-связывающий кассетный белок G2, который, как полагают, определяет фенотип SP-клеток).

Из скелетных мышц была выделена побочная клеточная популяция — SMSP (Skeletal Muscle Side Population), клетки которой имеют сферическую форму и плохо адгезируются к поверхности культурального пластика [7]. SMSP характеризуются маркерами sca-1+, CD34+, CD45+/-, c-kit+/-, десмин [19, 23]. По мнению А. Burdzinska и соавт. (2008), фенотип этих клеток обусловлен не столько особенностями их происхождения, сколько низким уровнем дифференцировки [21].

Неспособность культивированных SMSP-клеток к спонтанной дифференцировке в миогенном направлении была отмечена А. Asakura и соавт. (2002): для реализации миогенного потенциала этих клеток необходимо присутствие в среде соответствующих индукционных факторов [23]. Так, обе выделенные субпопуляции SMSP-клеток: CD45⁻ и CD45⁺ — проявляли миогенный потенциал после сокультивирования с первичной культурой миобластов, выступающей в этом случае в роли индуктора. После трансплантации в дистрофичную мышечную ткань и та, и другая субпопуляция участвовали в образовании новых мышечных волокон, причем CD45⁻ дифференцировалась в мышечные волокна в более высокой степени по сравнению с CD45⁺ [23, 24].

Наряду с миогенным потенциалом в исследованиях, проведенных как *in vitro*, так и *in vivo*, выявлена способность SMSP-клеток дифференцироваться в гемопоэтические [23, 25] и эндотелиальные (CD31⁺) клетки [26]. На их поверхности была выявлена экспрессия рецепторов Ang2 и Tie2, которые активируются ангиопоэтинами [27]. Можно полагать, что SMSP-клетки имеют общих предшественников как с гемопоэтическими, так и с эндотелиальными клетками.

В работах Е. Gussoni и соавт. (1999) было показано, что при внутривенном (системном) введении SMSP-клеток mdx мышам в их скелетных мышцах происходит образование дистрофин-позитивных мышечных волокон [7]. По наблюдениям других исследователей, при системном введении SMSP-клеток с фенотипом Pax7⁺CD34⁺Sca-1⁺ они задерживаются в мышечной интерстиции в непосредственной близости к эндотелию [8, 23, 28, 29]. Способность SMSP-клеток (в противоположность СК и миобластам) мигрировать из кровотока в мышечную ткань является принципиально важным свойством: при их внутривенном введении есть вероятность восстановления всех скелетных мышц, а не только поверхностных, как при внутримышечном.

В ряде исследований ставился вопрос о взаимоотношениях SMSP-клеток и СК. Р. Seale и соавт. (2000) [30], А. Asakura и соавт. (2002) [23] отмечали, что в мышцах Pax7-дефицитных мышей отсутствуют СК, а SMSP-клетки, напротив, присутствуют. Этот факт, по всей видимости, свидетельствует о том, что последние представляют собой популяцию мышечных стволовых клеток, отличную от СК. В исследовании А. Asakura, М. Rudnicki (2002) было показано, что при введении в мышцы mdx мышей SMSP-клетки могут дифференцироваться в функциональные СК, экспрессирующие маркеры Pax7, Myf5 и десмин [27]. В более поздней работе К. Тапака и соавт. (2009) выделенная ими субпопуляция SMSP-клеток демонстрировала способность занимать нишу СК и давать начало новым СК [31].

Миогенный потенциал SMSP-клеток, их способность мигрировать через сосудистую стенку, возможность системного введения позволяют рассматривать применение SMSP-клеток как перспективный метод лечения пациентов с мышечными дистрофиями [4]. В настоящее время по этой теме проводятся интенсивные исследования.

Мышечные стволовые клетки с фенотипом CD133⁺

Еще одну популяцию мышечных стволовых клеток, обладающих миогенным потенциалом, описали Y. Torrente и соавт. (2007) [32]. Из мышц здоровых людей и пациентов с DMD исследователи выделили

стволовые клетки, экспрессирующие на своей поверхности гликопротеин CD133 (маркер незрелых гемопоэтических клеток). Эти клетки с фенотипом CD133⁺ экспрессировали также маркеры CD34, CD45 и обладали способностью к дифференцировке в миогенном и эндотелиальном направлениях. Ранее были выделены стволовые клетки с фенотипом CD133⁺ костномозгового происхождения, также способные дифференцироваться в обоих этих направлениях [33, 34]. M. Gavina и соавт. (2006) описали стволовые свойства этих циркулирующих в крови клеток, их способность восстанавливать экспрессию дистрофина и пул СК в мышцах scid/mdx мышей после внутримышечного и внутриартериального введения [35].

Исследования, проведенные E. Negróni и соавт. (2009), показали, что стволовые клетки с фенотипом CD133⁺, выделенные из скелетных мышц, экспрессируют маркер СК CD56 и обладают способностью к образованию миотуб с фенотипом MyHC⁺, содержащих тяжелую цепь миозина [36].

R. Venchaoui и соавт. (2007) отмечали, что клетки CD133⁺, выделенные из мышц человека, после трансплантации dmх мышцам способствовали экспрессии функционального дистрофина человека у мышей, образованию новых мышечных волокон, улучшению функциональных показателей дистрофичных мышц [37]. При этом клетки CD133⁺ идентифицировались под базальной мембраной в нишах СК вдоль новообразованных мышечных волокон и экспрессировали M-кадгерин. Оба эти факта могут указывать на дифференцировку клеток CD133⁺ в направлении СК. Об этом свидетельствуют также результаты исследований E. Negróni и соавт. (2009) [36].

Следующим шагом в исследовании стволовых клеток с фенотипом CD133⁺, выделенных из мышц пациентов с DMD, стало определение их способности к восстановлению экспрессии «короткого» и функционального дистрофина. С этой целью была осуществлена их генно-инженерная модификация посредством трансдукции лентивирусом (для исключения из транскрипции мутировавшего экзона 51) с последующей внутримышечной трансплантацией модифицированных клеток CD133⁺ иммунодефицитным scid/mdx мышам. Результаты исследований продемонстрировали восстановление экспрессии дистрофина, регенерацию мышечных волокон и улучшение функциональных показателей дистрофичных скелетных мышц [32, 33, 37-40].

В этих же исследованиях выполняли системное (внутриартериальное) введение генно-модифицированных стволовых клеток с фенотипом CD133⁺ больным DMD (миодистрофия Дюшена) — как следствие, наблюдали восстановление функциональной ак-

тивности мышц и повышение физической выносливости таких пациентов. Полученные результаты подтверждают предположение о том, что трансплантированные культивированные мышечные стволовые клетки с фенотипом CD133⁺, способны к хоумингу, могут мигрировать в поврежденные скелетные мышцы и восстанавливать их структуру и функции. А это дает надежду на возможность восстановления с их помощью всей скелетной мускулатуры у пациентов с DMD.

Представляет также несомненный интерес стратегия, предложенная C. Riviere и соавт. (2006), основанная на использовании модифицированных аутологических CD133⁺ клеток, полученных из мышц пациентов с DMD и трансплантированных внутриартериально [41]. (Модификацию CD133⁺ клеток осуществляли путем введения гена, кодирующего функциональный дистрофин, или методом «пропуска экзона»).

Такой подход, как полагают исследователи, должен привести к восстановлению всех дистрофичных скелетных мышц организма без риска иммунологического отторжения трансплантированных клеток, наблюдаемого при введении аллогенных СК/миобластов.

Для лечения пациентов с DMD возможно применение как мышечных, так и выделенных из крови стволовых клеток с фенотипом CD133⁺. Их терапевтические возможности обусловлены способностью мигрировать в скелетные мышцы после системного введения, дифференцироваться не только в миогенном, но и в эндотелиальном направлении [34, 35], что приводит к усилению васкуляризации скелетных мышц [33]. После внутриартериальной трансплантации клетки CD133⁺ участвуют в регенерации мышечных волокон, а также экспрессии не только функционального дистрофина, но и дистрофин-связанных белков α - и β -саркогликанов. Однако сравнение клеточных популяций с фенотипом CD133⁺, выделенных из мышц и крови пациентов с DMD, показало, что генетически модифицированные клетки CD133⁺ мышечного происхождения обладают более высоким регенераторным потенциалом по сравнению с клетками CD133⁺, выделенными из крови [37]. Двойные слепые клинические исследования (фаза I), проведенные Y. Togente и соавт. (2007), подтвердили безопасность применения аутологических клеток с фенотипом CD133⁺, выделенных из мышечной ткани (данные клетки были внутримышечно введены 8 молодым пациентам с DMD; срок наблюдений составил 7 мес. [32]).

Следует подчеркнуть: прежде чем стволовые клетки с фенотипом CD133⁺ могут быть использованы в медицинской практике, предстоит решить целый ряд вопросов. Необходимо, в частности, добиться по-

вышения пролиферативного потенциала клеток CD133⁺, выделенных из крови, с целью увеличения их экспансии; разработать условия криохранения клеток CD133⁺ для последующего применения в повторных курсах терапии; изучить степень их участия в процессах мышечной регенерации и возможности полного замещения ими ниши резидентных СК [4, 33].

Стволовые клетки немышечного происхождения, обладающие миогенным потенциалом

Стволовые клетки, выделенные из костного мозга

Из клеток немышечного происхождения в качестве инструмента для лечения мышечных дистрофий в первую очередь рассматривают костномозговые стволовые клетки. Выделяют два их типа — мультипотентные гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), экспрессирующие маркер CD45, и мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга (ММСК_{км}), негативные по этому маркеру [42—44]. При патологии скелетной мышечной ткани костномозговые стволовые клетки способны мигрировать в поврежденные мышцы и участвовать в образовании новых мышечных волокон [45]. Принято считать, что в этом процессе могут участвовать и ГСК, и ММСК_{км}. Так, E. Gussoni и соавт. (1992) показали, что при внутривенном введении ГСК mdx мышам происходит миграция этих клеток в скелетные мышцы, что приводит к частичному восстановлению экспрессии дистрофина в мышечных волокнах [46]. Десять лет спустя M. La Varge и соавт. (2002) продемонстрировали, что после введения ММСК_{км} облученным мышам, аблятивным по СК, трансплантированные клетки идентифицировались в нише СК и участвовали в регенерации мышечных волокон [47].

Механизм мобилизации клеток из костного мозга и их последующей миграции в мышечную ткань до конца не изучен [25]. Полагают, что поврежденные мышцы продуцируют определенные лиганды — цито- и хемокины/факторы роста, которые за счет химического градиента «привлекают» циркулирующие в крови стволовые клетки в поврежденную скелетно-мышечную ткань [48, 49]. Рецепторы c-met, CXCR4, LIF-R, находящиеся на поверхности костномозговых стволовых клеток, позволяют им принимать сигналы от поврежденных мышц, в соответствии с которыми эти клетки мигрируют из костного мозга к областям с высокой концентрацией лигандов. Выявлено, что поврежденные мышцы содержат больше «пришлых» стволовых клеток, чем неповрежденные [22]. К настоящему времени известна роль в процессе миграции клеток костного мозга таких факторов, как HGF (фактор роста гепатоцитов), SDF-1 (стро-

мальный фактор-1), LIF (фактор ингибирования лейкемии), IGF-1 (инсулиноподобный фактор роста-1) [48, 50]. (Замечено, что физиологические стрессы, которые испытывает здоровый организм в течение жизни, также активируют миграцию в мышцы циркулирующих в крови костномозговых стволовых клеток [51]).

Стволовые клетки костного мозга, мигрировавшие в мышечную ткань, под влиянием локальных сигналов, поступающих от миогенного микроокружения, постепенно изменяют и фенотип, и дифференцировочный потенциал [25]. S. McKinney-Freeman и соавт. (2003) провели сравнительный анализ фенотипов CD45⁺ клеток, выделенных из костного мозга и из скелетных мышц (после их миграции в мышцы) [52]. Результаты исследований выявили существенное (более чем в 1000 раз) уменьшение содержания c-kit белков в «пришлых» клетках мышц и снижение (более чем в 22 раза) способности этих клеток дифференцироваться в гемопоэтическом направлении. Со временем костномозговые стволовые клетки локализуются в нишах СК и приобретают фенотип M-кадгерин+ [53].

T. Ichim и соавт. показали, что после трансплантации пациентам с DMD ММСК_{км} сливаются с мышечными волокнами реципиента и увеличивают активность эндогенных стволовых клеток посредством паракринного эффекта [54]. В исследованиях была установлена способность ММСК_{км} подавлять иммунновоспалительные реакции [55, 56]. K. Nemeth и соавт. (2009) показали, что культивированные ММСК_{км} могут, модулируя активность макрофагов, ингибировать воспалительные процессы [57]. Это свойство служит весомым аргументом в пользу применения ММСК_{км} в лечении больных с мышечной дистрофией — заболеванием, неизбежно сопровождающимся воспалением [5].

Большинство исследователей рассматривают именно эту популяцию костномозговых стволовых клеток в качестве наиболее перспективной для применения при лечении патологии скелетной мускулатуры. Однако следует отметить, что мнения ученых относительно величины миогенного потенциала популяции ММСК_{км} неоднозначны. Часть исследователей полагает, что вся популяция ММСК_{км} при соответствующей индукции способна дифференцироваться в миобласты, другие указывают лишь на какую-то одну из субпопуляций ММСК_{км} [21].

В последнее время разработка методов индукции дифференцировки ММСК_{км} в миогенном направлении стала одним из приоритетных направлений целого ряда исследований. M. Dezawa и соавт. (2005) предложили технологию, которая позволяет осуществить дифференцировку первичного пула ММСК_{км} в мио-

генном направлении с результативностью до 89% [58]. Исследователи культивировали ММСК_{км} в среде, содержащей цитокины и ростовые факторы (bFGF, PDGF, NRG-1), с последующей трансфекцией гена, кодирующего высвобождение внутриклеточного домена (NICD) рецептора Notch 1. В результате были получены клетки, описанные авторами как миогенные ММСК_{км} (М-ММСК_{км}), которые экспрессировали миогенные маркеры (Myo-D, миогенин) и обладали способностью к слиянию в миотубы (индекс слияния составил 20%). При этом М-ММСК_{км} были позитивны по специфическим маркерам СК — фактору транскрипции Pax7 и c-met рецептору.

Альтернативный подход к индукции миогенеза в ММСК_{км} базируется на контакте этих клеток с миогенным микроокружением [21]. В эксперименте J. Lee и соавт. (2005) ММСК_{км}, сокультивированные с СК, демонстрировали способность дифференцироваться в миотубы [59], что подтверждает не только наличие у ММСК_{км} миогенного потенциала, но и значимость непосредственного контакта между клетками. Однако степень дифференцировки клеток при таком способе индукции ограничена: только 1—2% многоядерных миотуб проявляли экспрессию GFP-специфического флуоресцентного белка, который предварительно метили клетки.

Вопрос о дальнейшем «поведении» ММСК_{км} после их пересадки в скелетные мышцы рассматривали D. Shi и соавт. (2004) [60]. Оказалось, что после внутримышечного введения ММСК_{км} способны дифференцироваться в миогенном направлении, но доля дифференцированных клеток (как и в условиях *in vitro*) невысока: всего 0,44% от всех трансплантированных ММСК_{км} слились в миотубы.

В настоящее время проводятся клинические исследования терапевтических возможностей аутологичных ММСК_{км} в лечении пациентов с DMD, в частности испытания I/II фазы с целью оценки безопасности и эффективности интраэпикального, внутривенного и внутримышечного применения таких клеток (NCT01834066; NCT02241434; NCT01834040; NCT0224192; NCT02245711 [70-74]).

Таким образом, результаты проведенных к сегодняшнему дню исследований подтверждают, что ММСК_{км} представляют интерес как для терапии мышечных дистрофий, так и для других направлений регенеративной медицины, что обусловлено рядом факторов:

- ММСК_{км} обладают мультипотентным потенциалом (способны дифференцироваться во все типы клеток (миобласты [58, 59], остеобласты, хондробласты, адипоциты [44, 61—64], кардиомиоциты [65, 66], эндотелиальные [55] и гладкомышечные клетки

[67]), происходящие из мезодермального зародышевого листка;

- отличаются уникальной способностью подавлять иммуно-воспалительные реакции [55, 56, 68];
- техника забора образца костного мозга относительно проста [69].

Однако для использования ММСК_{км} как активной составляющей терапии миодегенеративных заболеваний необходимо решение таких задач, как усиление миогенного потенциала этого типа клеток, определение эффективности и безопасности их применения и др.

В качестве еще одного варианта рассматриваются возможности использования ММСК, полученных из других источников и характеризующихся более выраженным миогенными свойствами. В исследовании C. De Bari и соавт. (2003) описан высокий миогенный потенциал ММСК, выделенных из синовиальной оболочки взрослого человека: после внутримышечной трансплантации mdx мышам эти клетки активно формировали новые мышечные волокна, экспрессирующие дистрофин, и участвовали в пополнении пула СК в мышцах [75].

E. Gang и соавт. (2004) выделили из пуповинной крови ММСК, способные дифференцироваться в клетки скелетной мышечной ткани, экспрессирующие поздние миогенные маркеры, в частности MyoD [76].

Y. Choi и соавт. (2012) показали, что ММСК, выделенные из жировой ткани, обладают более высоким миогенным дифференцировочным потенциалом по сравнению с костномозговыми ММСК [77].

В исследовании В. Зорина и соавт. (2014) миогенный потенциал демонстрировали ММСК, выделенные из слизистой оболочки полости рта (десны) — легкодоступного источника клеточного материала. В этом случае получение образца ткани малотравматично, раневой дефект заживает быстро и без образования рубца, для получения требуемого количества клеток достаточно небольшого (2—3 мм³) объема биоптата [78]. Изолированная авторами субпопуляция ММСК характеризовалась высоким пролиферативным потенциалом (почти в два раза выше, чем у ММСК_{км}). Миогенная индукция этих клеток в условиях *in vitro* приводила к образованию многоядерных миотуб, при этом эффективность миогенной дифференцировки, независимо от пассажа ММСК (вплоть до десятого), оставалась на неизменно высоком уровне.

Таким образом, с точки зрения миогенного потенциала наряду с ММСК_{км} интерес представляют также и ММСК некостномозгового происхождения: будучи сравнимы по миогенным свойствам с ММСК_{км}, они при этом имеют и ряд преимущ-

ществ. Необходимо дальнейшее изучение этих клеточных популяций и возможностей их применения в клеточной терапии патологии мышечной ткани.

Мезоангиобласты

Мезоангиобласты представляют собой мультипотентные стволовые клетки мезодермального происхождения, ассоциированные с развивающейся сосудистой сетью [79]. Предполагается, что эти клетки являются одной из субпопуляций перицитов (мезенхимальных стволовых клеток, локализованных в стенках микрососудов) [80]. Они экспрессируют маркеры ранних эндотелиальных клеток (ангиобластов) — Sca-1, Flk-1, CD34, а также маркеры, характерные для всех клеток мезодермального происхождения [81]. Мезоангиобласты хорошо культивируются и при соответствующей индукции способны дифференцироваться в большинство типов клеток мезодермального происхождения, включая миогенные [79, 82].

M. Sampaolesi и соавт. (2003) показали, что после внутриартериальной трансплантации мезоангиобластов взрослым мышам эти клетки способны продуцировать α -саркогликан 2/2 [83] и занимать нишу СК [84]. G. Cossu и соавт. (2007) выявили, что трансплантация генномодифицированных мезоангиобластов, экспрессирующих микродистрофин человека, scid/mdx мышам и GRMD собакам способствовала образованию в мышцах животных дистрофин-позитивных миофибрилл [85]. При этом у собак наряду с высокой экспрессией дистрофина наблюдалось также улучшение функций скелетных мышц. В исследовании F. Tedesco и соавт. (2011) было отмечено, что после трансплантации scid/mdx мышам генномодифицированных мезоангиобластов, несущих полный локус гена дистрофина человека, происходит образование мышечных волокон, экспрессирующих дистрофин и пополнение пула СК [86].

Исследование M. Sampaolesi и соавт. (2003) также показало способность мезоангиобластов к миграции в поврежденные мышцы после внутриартериального введения и восстановлению структуры и функций мышечной ткани. Эти наблюдения подтверждают возможность и целесообразность применения мезоангиобластов в системной терапии всех скелетных мышц организма [87].

Положительные результаты доклинических испытаний послужили основанием для инициации клинических исследований. В настоящее время A. Rini и соавт. проводят вторую фазу испытаний, в ходе которых изучается применение HLA-идентичных аллогенных мезоангиобластов в лечении DMD (EudraCT no. 2011-000176-33) [88].

Обобщая мнение многих исследователей, следует признать, что технология с применением мезоангиобластов может стать одной из наиболее эффективных в плане лечения мышечных дистрофий [86—90].

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки — iPSCs

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки — iPSCs (induced Pluripotent Stem Cells), представляют собой фибробласты кожи человека, перепрограммированные посредством 4 специфических факторов — Oct3/4, Klf4, Sox2, c-myc (открыты S. Yamanaka и соавт.) в плюрипотентные стволовые клетки. Последние способны дифференцироваться в любой тип тканеспецифичных клеток, включая миогенные [91]. Так, из iPSCs уже успешно получены двигательные нейроны [92], гепатоциты [93], гемопоэтические клетки [94], кардиомиоциты [95], мезенхимальные стволовые клетки [96].

С целью активации в iPSCs миогенной программы используют индукторы основных миогенных регуляторов — Pax3, Pax7 и MyoD [97—101]. Доклинические исследования показали, что полученные скелетные миогенные клетки-предшественники хорошо приживались после внутримышечного введения mdx мышам, не вызывали образования тератом или какого-либо иных клеточных аномалий (срок наблюдений составил 146 недель) [99], способствовали улучшению функциональной активности мышц [97—99].

В исследовании Y. Mizuno и соавт. (2010) наблюдали iPSCs, сходные по своим свойствам с СК [102]. В 2012 г. A. Filareto и соавт. из iPSCs получили клетки с фенотипом Pax7⁺, которые после внутримышечной трансплантации mdx мышам активно продуцировали дистрофин и пополняли популяцию СК в мышцах [103].

Активно проводятся исследования по генетическому модифицированию полученных из iPSCs миогенных клеток с целью придания им определенных функций, необходимых для лечения мышечных дистрофий различных типов [97—103]. Так, R. Darabi и соавт. (2008) получили из iPSCs микро-атрофин — генетически модифицированные миогенные клетки, внутримышечная трансплантация которых мышам с двойным нокаутом (dKO) — по дистрофину и атрофину — способствовала улучшению функциональной активности мышц животных [97].

Группа ученых под руководством F. Tedesco (2012) провела исследования с наблюдением больных LGMD-2D (Limb-Girdle Muscular Dystrophy) — конечностно-поясной формой прогрессирующей мышечной дистрофии. Авторы получили из iPSCs мезоангиобласты, которые затем модифицировали посредством лентивируса, кодирующего ген α -саркогликана

человека. Внутримышечная трансплантация таких генетически модифицированных мезоангиобластов иммунодефицитным мышам, у которых отсутствовал этот ген (*sarcoglycan-null* мышам), вызывала экспрессию α -саркогликана в их мышечных волокнах [101].

Использование iPSCs в регенеративной медицине — направление с большим будущим: персональные клеточные линии, полученные у пациентов с мышечной дистрофией, можно будет применять не только для их лечения аутологичными клетками, но и для исследования механизмов данной патологии (путем создания «тканевых моделей» заболевания на основе клеток, полученных от самих пациентов) и скрининга лекарственных препаратов [5, 92, 104, 105]. Однако для реализации этих возможностей в медицинской практике необходимо предстоит провести еще множество доклинических и клинических исследований с тем, чтобы разработать абсолютно безопасный и максимально эффективный метод лечения мышечных дистрофий.

Заключение

За последние два десятилетия усилиями ученых-специалистов в области клеточной медицины и биологии выявлено множество популяций клеток, обладающих миогенным потенциалом, как мышечного, так и немышечного происхождения, каждая из которых является привлекательным кандидатом на «участие» в клеточной терапии. Тем не менее о масштабном внедрении клеточных технологий в клиническую практику лечения мышечных заболеваний говорить еще рано, так как для этого необходимо решение большого ряда довольно непростых вопросов.

В процессах тканевой регенерации скелетных мышц активно участвует целый комплекс мышечных стволовых/прогениторных клеток (СК, MDSCs, CD133⁺, SMSF, среди которых главную роль исполняют СК, локализованные в мышечных волокнах в специфических, сложно устроенных нишах, четко регулирующих их функционирование. Все другие миогенные клетки, как полагают, являются составляющими локального микроокружения СК и также вносят определенный вклад в регенерацию скелетной мускулатуры [106, 107]. Как соотносятся между собой эти клетки-предшественники, содержащиеся в мышечной ткани? Являются ли они различными звеньями иерархической цепи, находящимися на разных стадиях дифференцировки? Происходят ли от общей недифференцированной стволовой клетки или имеют разных предшественников? Каковы их взаимоотношения с СК? Ответов на эти вопросы пока нет, но решить их — принципиально важно для разработки

наиболее эффективной клеточной стратегии лечения пациентов с мышечными заболеваниями.

Одновременно с мышечными стволовыми клетками идентифицированы также клетки «немышечного» происхождения, обладающие миогенным потенциалом, которые также вносят свой вклад в процесс регенерации скелетных мышц. В их число входят ММСК_{км} (стволовые клетки костного мозга), циркулирующие в крови стволовые клетки CD133⁺, мезоангиобласты, iPSCs (индуцированные плюрипотентные стволовые клетки). Но для использования данных клеточных популяций в медицинской практике еще предстоит решить ряд задач: в частности, определить наиболее эффективные методы индукции дифференцировки этих клеток в миогенном направлении, подтвердить безопасность и эффективность их применения, оценить степень их участия в процессах мышечной регенерации и возможность полного замещения ими ниши резидентных СК.

Решению всех этих вопросов сегодня посвящены многие научные изыскания в области клеточных технологий, перспективных в плане лечения мышечных дистрофий. Так, проводятся клинические исследования возможности использования некоторых клеток с миогенным потенциалом в терапии пациентов с DMD (в частности, I/II фаза исследований проблем безопасности и эффективности применения аутологичных ММСК_{км} [70—74]; КИ I/II фазы — по применению HLA-идентичных аллогенных мезоангиобластов [88]).

Продолжаются поиски путей усовершенствования технологии, основанной на применении СК. Одним из наиболее перспективных считают биоинженерный подход к разработке способов культивирования популяции СК — имитация в условиях *in vitro* среды обитания клеток, что позволяет контролировать процесс их дифференцировки и сохранять миогенный потенциал в процессе культивирования [5, 108, 109].

L. Madden и соавт. (2015) удалось создать посредством биоинженерного метода функциональную модель скелетной мышцы человека (авторы использовали гидрогель (фибрин/матригель /3Dматрикс), специфические компоненты культуральной среды и первичные миогенные клетки, выделенные из мышц здоровых доноров). Полученная ими мышечная ткань представляет собой мышечные пучки (*myobundles*), состоящие из мультимерных поперечно-исчерченных мышечных волокон и СК с фенотипом Pax7⁺, desmin⁺, MyoD⁺. При воздействии электрическим током эти биомиметические мышечные пучки спонтанно отвечают подергиваниями и тетаническими сокращениями. Такая модель *in vitro* скелетной мышцы человека может быть использована вместо животной модели для доклинических исследований: тестирования

фармакологических препаратов, токсикологического скрининга и разработки новых терапевтических подходов к лечению различных мышечных заболеваний [110].

Особое внимание исследователей к СК вполне объяснимо: эти клетки и их ниша представляют собой оптимальную модель для изучения биологии взрослых тканеспецифических стволовых клеток. Выделение СК из ассоциированных с ними мышечных волокон, а также культивирование изолированных мышечных волокон в условиях *ex vivo* позволяют исследовать базисные биологические процессы в стволовых клетках, влияние внешних факторов на их пролиферацию, механизмы программирования клеток и их переход к миогенной дифференцировке. В связи с высокой гетерогенностью популяции СК большой интерес вызывает ее иерархическая организация [5]. Понимание всех этих процессов важно и в практическом плане — для разработки терапевтических подходов к лечению мышечных заболеваний.

Особые надежды ученые возлагают на инновационную технологию, связанную с индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (iPSCs), которую активно разрабатывают сегодня в ведущих лабораториях мира [91]. Ее создание открывает широкие перспективы для получения аутологичной клеточной популяции, обладающей высоким регенеративным потенциалом *in vivo*, — наиболее эффективной в лечении пациента с мышечной дистрофией. Плюрипотентный потенциал этих уникальных клеток дает возможность «заставить» их дифференцироваться в заданном направлении и получить нужную клеточную популяцию с высоким регенеративным потенциалом в необходимом для проведения терапии количестве.

Приведенные в настоящем обзоре результаты интенсивных научных изысканий позволяют сделать достаточно оптимистичный вывод: исследования клеточных популяций, обладающих миогенным потенциалом, функций СК и их микроокружения, технологии iPSCs, методов генного модифицирования используемых клеток с высокой степенью вероятности приведут к созданию эффективной стратегии лечения мышечных дистрофических заболеваний.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №14-25-00166).

References

1. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. 1961; 9: 493-5.
2. Shi X., Garry D.J. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev*. 2006; 20: 1692-708.

3. Sambasivan R., Tajbaksh S. Skeletal muscle stem cell birth and properties. *Semin. Cell Dev. Biol*. 2007; 18: 870-82.
4. Farini A., Razini P., Erratico S., et al. Cell Based Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *J. Cell. Physiol*. 2009; 221: 526-34.
5. Merregalli M., Farini A., Sitziaand G., Torrente Y. Advancements in stem cells treatment of skeletal muscle wasting. *Pathophysiology of skeletal muscle*. 2014; 5:1-12.
6. Arriero M., Brodsky S., Gealekman O., et al. Adult skeletal muscle stem cells differentiate into endothelial lineage and ameliorate renal dysfunction after acute ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004; 287: 621-27.
7. Gussoni E., Soneoka Y., Strickland C., et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. 1999; 401: 390-4.
8. Torrente Y., Tremblay J., Pisati F., et al. Intra-arterial injection of muscle-derived CD34(+) Sca-1(+) stem cells restores dystrophin in mdx mice. *J. Cell Biol*. 2001; 152: 335-48.
9. Sarig R., Baruchi Z., Fuchs O., et al. Regeneration and transdifferentiation potential of muscle-derived stem cells propagated as myospheres. *Stem Cells*. 2006; 24: 1769- 78.
10. Tamaki T., Okada Y., Uchiyama Y., et al. Clonal multipotency of skeletal muscle-derived stem cells between mesodermal and ectodermal lineage. *Stem Cells*. 2007; 25: 2283-90.
11. Alessandri G., Pagano S., Bez A., et al. Isolation and culture of human muscle-derived stem cells able to differentiate into myogenic and neurogenic cell lineages. *Lancet*. 2004; 364: 1872-83.
12. Qu-Petersen Z., Deasy B., Jankowski R., et. al. J. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol*. 2002; 157: 851-64.
13. Rouger K., Larcher T., Dubreil L., et al. Systemic delivery of allogenic muscle stem cells induces long-term muscle repair and clinical efficacy in duchenne muscular dystrophy dogs. *Am. J. Pathol*. 2011; 179: 2501-18.
14. Torrente Y., Camirand G., Pisati F., Belicchi M., et. al. Identification of a putative pathway for the muscle homing of stem cells in a muscular dystrophy model. *J Cell Biol*. 2003; 162: 511-20.
15. Deasy B., Jankowski R., Huard J. Muscle-derived stem cells: Characterization and potential for cell-mediated therapy. *Blood Cells Mol Dis*. 2001; 27: 924-33.
16. Deasy B., Gharaibeh B., Pollett J., Jones M., et al. Long-term self-renewal of postnatal muscle-derived stem cells. *Mol Biol Cell*. 2005; 16: 3323-33.
17. Lee J., Qu-Petersen Z., Cao B., et. al. Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J Cell Biol*. 2000; 150: 1085-100.
18. Kuroda R., Usas A., Kubo S., et. al. Cartilage repair using bone morphogenetic protein 4 and muscle-derived stem cells. *Arthritis Rheum*. 2006; 54: 433-42.
19. Sherwood R., Christensen J., Conboy I., et. al. Isolation of adult mouse myogenic progenitors: functional heterogeneity of cells within and engrafting skeletal muscle. *Cell*. 2004; 119:543-54.
20. Zuba-Surma E., Abdel-Latif A., Case J., et. al. Sca-1 expression is associated with decreased cardiomyogenic differentiation potential of skeletal muscle-derived adult primitive cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2006; 41: 650-60
21. Burdzinska A., Gala K., Pczek L. Myogenic stem cells. *Folia Histochem Cytobiol*. 2008; 46(4): 401-12.

22. Scharenberg C., Harkey M., Torok-Storb B. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood*. 2002; 99: 507-12.
23. Asakura A., Seale P., Girgis-Gabardo A., et al. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol*. 2002; 159: 123-34
24. McKinney-Freeman S., Jackson K., Camargo F., et al. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 1341-6.
25. Jackson K., Mi T., Goodell M. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 14482-6.
26. Uezumi A., Ojima K., Fukada S., et al. Functional heterogeneity of side population cells in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 341: 864-73.
27. Asakura A., Rudnicki M. Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation. *Exp Hematol*. 2002; 30: 1339-45.
28. Kallestad K., McLoon L. Defining the heterogeneity of skeletal muscle-derived side and main population cells isolated immediately *ex vivo*. *J Cell Physiol*. 2010; 222: 676-84.
29. Tamaki T., Akatsuka A., Okada Y., et al. Growth and differentiation potential of main- and side-population cells derived from murine skeletal muscle. *Exp Cell Res*. 2003; 291, 83-90.
30. Seale P., Sabourin L., Girgis-Gabardo A., et al. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*. 2000; 102: 777-86.
31. Tanaka K., Hall J., Troy A., Cornelison D., et al. Syndecan-4-expressing muscle progenitor cells in the SP engraft as satellite cells during muscle regeneration. *Cell Stem Cell*. 2009; 4: 217-25.
32. Torrente Y., Belicchi M., Marchesi C. et al. Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients. *Cell Transplant*. 2007; 16: 563-77.
33. Perault B., Rudnicki M., Torrente Y., et al. Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther*. 2007; 15: 867-77.
34. Torrente Y., Belicchi M., Sampaolesi M., et al. Human circulating AC133+ stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest*. 2004; 114: 182-95.
35. Gavina M., Belicchi M., Rossi B., et al. VCAM-1-expression on dystrophic muscle vessels has a critical role in the recruitment of human blood-derived CD133+ stem cells after intra-arterial transplantation. *Blood*. 2006; 108: 2857-66.
36. Negroni E., Riederer I., Chaouch S., et al. In vivo myogenic potential of human CD133+ muscle-derived stem cells: a quantitative study. *Mol. Ther*. 2009; 17: 1771-8.
37. Benchaouir R., Meregalli M., Farini A., et al. Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. *Cell Stem Cell*. 2007; 13: 646-57.
38. Goyenvallé A., Vulin A., Fougerousse F., et al. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science*. 2004; 306: 1796-9.
39. Denti M., Rosa A., D'Antona G., et al. Chimeric adeno-associated virus/antisense U1 small nuclear RNA effectively rescues dystrophin synthesis and muscle function by local treatment of mdx mice. *Hum Gene Ther*. 2006; 17: 565-74.
40. Meng J., Chun S., Asfahani R., et al. Human skeletal muscle-derived CD133(+) cells form functional satellite cells after intramuscular transplantation in immunodeficient host mice. *Mol. Ther*. 2014; 22: 1008-17.
41. Riviere C., Danos O., Douar A. Long-term expression and repeated administration of AAV type 1, 2 and 5 vectors in skeletal muscle of immune competent adult mice. *Gene Ther*. 2006; 13: 1300-8.
42. Friedenstein A.J., Deriglasova U., Kulagina N., et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. 1974; 2 (2): 83-92.
43. Lennon D., Caplan A. Isolation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2006; 34: 1604-5.
44. Bianco P., Robey P., Simmons P. J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. 2008; 2: 313-19.
45. Ferrari G., Stornaiuolo A., Mavilio F. Failure to correct murine muscular dystrophy. *Nature*. 2001; 411: 1014-15.
46. Gussoni E., Pavlath G., Lanctot A., Sharma K., et al. Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature*. 1992; 356:435-8.
47. LaBarge M., Blau H. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell*. 2002; 111: 589-601.
48. Kucia M., Wojakowski W., Reza R., et al. The migration of bone marrow-derived non-hematopoietic tissue-committed stem cells is regulated in an SDF-1-, HGF-, and LIF-dependent manner. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2006; 54: 121-35.
49. Rosu-Myles M., Stewart E., Trowbridge J., et al. A unique population of bone marrow cells migrates to skeletal muscle via hepatocyte growth factor/c-met axis. *J Cell Sci*. 2005; 118: 4343-52.
50. Sacco A., Doyonnas R., La Barge M., et al. IGF-I increases bone marrow contribution to adult skeletal muscle and enhances the fusion of myelomonocytic precursors. *J Cell Biol*. 2005; 171: 483-92.
51. Palermo A., Labarge M., Doyonnas R., et al. Bone marrow contribution to skeletal muscle: a physiological response to stress. *Dev Biol*. 2005; 279: 336-44.
52. McKinney-Freeman S., Majka S., Jackson K., et al. Altered phenotype and reduced function of muscle-derived hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*. 2003; 31: 806-14.
53. Dreyfus P., Chretien F., Chazaud B., et al. Adult bone marrow-derived stem cells in muscle connective tissue and satellite cell niches. *Am J Pathol*. 2004; 164:773-9.
54. Ichim T., Alexandrescu D., Solano F., et al. Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cell Immunol*. 2010; 260: 75-82.
55. Oswald J., Boxberger S., Jorgensen B., et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*. 2004; 22 (3): 377-84.
56. Griffin M., Elliman S., Cahill E., et al. Concise review: adult mesenchymal stromal cell therapy for inflammatory diseases: how well are we joining the dots? *Stem Cells*. 2013; 31: 2033-41.
57. Nemeth K., Leelahavanichkul A., Yuen P., et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandinE(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat. Med*. 2009; 15: 42-9.

58. Dezawa M., Ishikawa H., Itokazu Y., et al. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science*. 2005; 309: 314-7.
59. Lee J.H., Kosinski P.A., Kemp D.M. Contribution of human bone marrow stem cells to individual skeletal myotubes followed by myogenic gene activation. *Exp Cell Res*. 2005;307: 174-82.
60. Shi D., Reinecke H., Murry C., Torok-Storb B. Myogenic fusion of human bone marrow stromal cells, but not hematopoietic cells. *Blood*. 2004; 104: 290-4.
61. Chaylakhyan R.K., Gerasimov Yu.V. Proliferative and differentiation potential of skeletal bone marrow colony-forming cells. *Cytology*. 1986; 28 (3): 341-9. (in Russian)
62. Caplan A. I. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res*. 1991; 9: 641-50.
63. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001; 7 (2): 211-28.
64. Hematti P. Mesenchymal stromal cells and fibroblasts: a case of mistaken identity? *Cytotherapy*. 2012; 14: 516-21.
65. Xu W., Zhang X., Qian H., et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004; 229: 623-31.
66. Antonitsis P., Ioannidou-Papagiannaki E., Kaidoglou A., et al. In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2007; 6: 593-7.
67. Hegner B., Weber M., Dragun D., Schulze-Lohoff E. Differential regulation of smooth muscle markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Hypertens*. 2005; 23: 1191-202.
68. Markert C., Atala A., Cann J. et al. Mesenchymal stem cells: emerging therapy for Duchenne muscular dystrophy. *PM R*. 2009; 1: 547-59.
69. Bobis S., Jarocha D., Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol*. 2006; 44: 215-30.
70. *Study Safety and Efficacy of Bone Marrow Derived Autologous Cells for the Treatment of Muscular Dystrophy*. Available at: (Assessed 5 May 2015)
71. Stem Cell Therapy in Duchenne Muscular Dystrophy. Available at: <https://clinicaltrials.gov/show/NCT02241434> (Assessed 5 May 2015)
72. *Study Safety and Efficacy of BMMNC for the Patient With Duchenne Muscular Dystrophy*. Available at: <https://clinicaltrials.gov/show/NCT01834040> (Assessed 5 May 2015)
73. Stem Cell Therapy in Muscular Dystrophy. Available at: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT02241928> (Assessed 5 May 2015)
74. Cell Therapy in Limb Girdle Muscular Dystrophy. Available at: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02245711?term=NCT02245711&rank=1> (Assessed 5 May 2015)
75. De Bari C., Dell'acchio F., Vandenabeele F., et al. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J. Cell Biol*. 2003; 160: 909-18.
76. Gang E., Jeong J., Hong S., et al. Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells*. 2004; 22: 617-24.
77. Choi Y., Vincent L., Lee A., Dobke M., et al. Mechanical derivation of functional myotubes from adipose-derived stem cells. *Biomaterials*. 2012; 33: 2482-91.
78. Zorin V.L., Eremin I.I., Rybko V.A. et al. Oral mucosa is a new source for myoblast derivation. *Genes and cells*. 2014; 9(3): 5-13. (in Russian)
79. Minasi M., Riminucci M., De Angelis L., et al. The mesoangioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development*. 2002; 129: 2773-83.
80. Dellavalle A., Sampaolesi M., Tonlorenzi R., et al. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat. Cell Biol*. 2007; 9: 255-67.
81. Cossu G., Bianco P. Mesoangioblasts-vascular progenitors for extravascular mesodermal tissues. *Curr Opin Genet Dev*. 2003; 13: 537-42.
82. Tagliafico E., Brunelli S., Bergamaschi A., et al. TGF beta/BMP activate the smooth muscle/bone differentiation programs in mesoangioblasts. *J. Cell Sci*. 2004; 117: 4377-88.
83. Sampaolesi M., Torrente Y., Innocenzi A., et al. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science*. 2003; 301: 487-92
84. Galvez B., Sampaolesi M., Brunelli S., et al. Complete repair of dystrophic skeletal muscle by mesoangioblasts with enhanced migration ability. *J Cell Biol*. 2006; 174: 231-43.
85. Cossu G., Sampaolesi M. New therapies for Duchenne muscular dystrophy: challenges, prospects and clinical trials. *Trends Mol. Med*. 2007; 13: 520-6.
86. Tedesco F., Hoshiya H., D'antona G., et al. Stem cell mediated transfer of a human artificial chromosome ameliorates muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med*. 2011; 3: 96ra78.
87. Sampaolesi M., Torrente Y., Innocenzi A., et al. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science*. 2003; 301: 487-92.
88. Rini A., Sitzia C., et al. Advancements in stem cells treatment of skeletal muscle wasting. *Front Physiol*. 2014; 5:48.
89. Galvez B., Sampaolesi M., Brunelli S., et al. Complete repair of dystrophic skeletal muscle by mesoangioblasts with enhanced migration ability. *J Cell Biol*. 2006; 174: 231-43.
90. Cossu G., Sampaolesi M. New therapies for Duchenne muscular dystrophy: challenges, prospects and clinical trials. *Trends Mol. Med*. 2007; 13: 520-6.
91. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126: 663-76.
92. Dimos J., Rodolfa K., Niakan K., et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008; 321: 1218-21.
93. Song Z., Cai J., Liu Y., et al. Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell Res*. 2009; 19: 1233-42.
94. Hanna J., Wernig M., Markoulaki S., et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*. 2007; 318: 1920-3.
95. Zwi L., Caspi O., Arbel G., et al. Cardiomyocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 2009; 120: 1513-23.
96. Lian Q., Zhang Y., Zhang J., Zhang H., et al. Functional mesenchymal stem cells derived from human induced

pluripotent stem cells attenuate limb ischemia in mice. *Circulation*. 2010; 121: 1113-23.

97. Darabi R., Gehlbach K., Bachoo R., et al. Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. *Nat. Med.* 2008; 14: 134-43.

98. Darabi R., Santos F., Filareto A., et al. Assessment of the myogenic stem cell compartment following transplantation of Pax3/Pax7-induced embryonic stem cell-derived progenitors. *Stem Cells*. 2011; 29: 777-90.

99. Darabi R., Arpke R., Irion S., et al. Human ES and iPS-derived myogenic progenitors restore DYSTROPHIN and improve contractility upon transplantation in dystrophic mice. *Cell Stem Cell*. 2012; 10: 610-19.

100. Goudenege S., Lebel C., Huot N., Dufour C., et al. Myoblasts derived from normal hESCs and dystrophic hiPSCs efficiently fuse with existing muscle fibers following transplantation. *Mol. Ther.* 2012; 20: 2153-67.

101. Tedesco F., Gerli M., Perani L., Benedetti S., et al., Transplantation of genetically corrected human iPSC-derived progenitors in mice with limb-girdle muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* 2012; 4(140): 140ra89.

102. Mizuno Y., Chang H., Umeda K., et al. Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. *FASEB J.* 2010; 24: 2245-53.

103. Filareto A., Darabi R., Perlingeiro R. Engraftment of ES-derived myogenic progenitors in a severe mouse model

of muscular dystrophy. *J. Stem Cell Res. Ther.* 2012; 10(1). pii: S10-001.

104. Egawa N., Kitaoka S., Tsukita K., et al. Drugs creening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci. Transl. Med.* 2012; 4, 145ra104.

105. Park I., Zhao R., West J., et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. 2008; 451: 141-6.

106. Usas A., Huard J. Muscle-derived stem cells for tissue engineering and regenerative therapy. *Biomaterials*. 2007; 28: 5401-6.

107. Judson R., Zhang R., Rossi F. Tissue-resident mesenchymal stem/progenitor cells in skeletal muscle: collaborators or saboteurs? *FEBS Journal*. 2013; 280: 4100-8.

108. Lutolf M., Gilbert P., Blau H. Designing materials to direct stem-cell fate. *Nature*. 2009; 462: 433-41.

109. Cosgrove B., Sacco A., Gilbert P., Blau H. A home away from home: challenges and opportunities in engineering *in vitro* muscle satellite cell niches. *Differentiation*. 2009; 78: 185-94.

110. Madden L., Juhas M., Kraus W.E., et al. Bioengineered human myobundles mimic clinical responses of skeletal muscle to drugs. *Elife*. 2015; 4:e04885.

Received 28.05.15

Сведения об авторах:

Зорин Вадим Леонидович канд. биол. наук, зав. отд. регенеративной медицины, Институт стволовых клеток человека

Зорина Алла Ивановна, канд. мед. наук, гл. науч. сотр., Институт стволовых клеток человека

Пулин Андрей Алексеевич, канд. мед. наук, зав. криобанком Центра биомедицинских технологий, ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

Копнин Павел Борисович, канд. мед. наук, зав. лаб. Цитогенетики, НИИ Канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАН

Еремин Илья Игоревич, канд. мед. наук, руководитель Центра биомедицинских технологий, ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

Малышев И.Ю.

Эпигенетические, посттранскрипционные и метаболические механизмы репрограммирования макрофагов

- ¹ — Московский Государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Министерство образования и науки России, 127473, Москва, ул. Делегатская, д. 20
² — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Федеральное агентство научных организаций, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Ключевую роль в способности иммунитета адекватно реагировать на патогенные факторы играют макрофаги. В зависимости от микроокружения и типа инфекции макрофаги могут быстро менять свой фенотип на провоспалительный M1 или на противовоспалительный M2 фенотип. Процесс смены фенотипа клетки обозначается термином «репрограммирование». Этот процесс играет центральную роль в иммунном ответе и поэтому его нарушение провоцирует развитие болезней. Репрограммирование макрофагов обеспечивают внутриклеточные сигнальные пути. Эти пути могут также контролировать эпигенетические, посттранскрипционные и метаболические механизмы фенотипической активности макрофагов. Эпигенетические механизмы могут быть разделены на механизмы репрограммирования M1 и M2 фенотипа. Ключевым компонентом посттранскрипционной регуляции являются микро-мРНК (миР). На M1-стимулы и на M2 стимулы экспрессируются разные наборы миРов. МиРы могут формировать как механизмы положительной обратной связи для быстрого репрограммирования макрофагов, так и механизмы отрицательной обратной связи, для ограничения чрезмерного воспаления, в случае формирования M1 фенотипа, а в случае формирования M2 фенотипа — ограничения падения бактерицидной активности. Репрограммирование макрофагов приводит к изменению метаболизма этих клеток. Формирование M1 фенотипа сопровождается сдвигом метаболизма аргинина в сторону активации NO-синтазы и увеличения продукции NO, увеличением вклада гликолиза в продукцию АТФ, увеличением депонирования бактериостатического железа. Формирование M2 фенотипа сопровождается сдвигом метаболизма аргинина в сторону активации аргиназы 1 и увеличения продукции мочевины, увеличением синтеза АТФ в митохондриях и увеличенного захвата жирных кислот, увеличением захвата гемового железа. Метаболический контроль фенотипа макрофагов также осуществляется благодаря положительным и отрицательным обратным связям. В целом репрограммирование фенотипа макрофагов вовлекает хорошо согласованные между собой изменения активности сигнальных, эпигенетических и посттранскрипционных механизмов и метаболизма. Детальное понимание механизмов репрограммирования окажет помощь в выборе терапевтических мишеней при разработке новых эффективных способов коррекции нарушенного иммунитета.

Ключевые слова: макрофаги; иммунитет; репрограммирование

Malyshev I.Y.

Epigenetic, post-transcriptional and metabolic mechanisms of macrophage reprogramming

Moscow 1 State Medico-Stomatological University. A.I.Evdokimova. The Ministry of education and science of Russia. 127473, Moscow, Russia
Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of general pathology and pathophysiology», 125315, Moscow, Russia

A key role in the ability of immunity to adequately respond to pathogenic factors play macrophages. Depending on the type of infection and the microenvironment macrophages can rapidly change their phenotype towards the proinflammatory M1 or antiinflammatory M2 one. The process of changing the cell phenotype is termed «reprogramming». This process plays a central role in the immune response and therefore its disturbance triggers the development of disease. Reprogramming of macrophages is provided by intracellular signaling pathways. These paths can also control epigenetic, post-transcriptional and metabolic mechanisms of phenotypic activity of macrophages. Epigenetic mechanisms can be divided into the reprogramming mechanisms towards M1 and M2 phenotype. A key component of post-transcriptional regulation is micro-mRNA (miR). On M1- and M2- stimuli macrophages express different sets of miRs. MiRs may form a positive feedback mechanism for quick reprogramming of macrophages and negative feedback mechanisms, to limit excessive inflammation in the case of M1 phenotype and to restrict fall bactericidal activity in the case of M2 phenotype. Reprogramming of macrophages leads to a change in the metabolism of these cells. Formation of M1 phenotype accompanied by a shift of the arginine metabolism towards NO-synthase activation and increased production of NO, an increase in the contribution of glycolysis to ATP production, increased deposition of bacteriostatic iron. Formation of the M2 phenotype is

accompanied by a shift of the arginine metabolism towards arginase 1 activation and increasing production of urea, increased ATP synthesis in mitochondria and increased capture of fatty acids, increased the capture of heme iron. Metabolic control of macrophage phenotype also involves the positive and negative feedback. In general, macrophage reprogramming involves very good coordinated and adapted to each other changes in the activity of signaling, epigenetic, post-translational and metabolic mechanisms. A detailed understanding of the mechanisms of reprogramming will assist in selecting the correct effective therapeutic targets to develop new ways for correction of impaired immunity.

Keywords: immunity; macrophages; reprogramming

Сокращения: ЛПС — липополисахарид; МЖТ — макрофаги жировой ткани; миР — микроРНК; ПК — природные киллеры; ПАМП — патоген-ассоциированные молекулярные паттерны; ПРМ — паттерн-распознающих молекул; ПРР — паттерн-распознающих рецепторов; Akt — протеинкиназа В (PKB); С/ЕВРβ — СААТ/enhancer-binding proteins β; HIF — гипоксия-индуцируемый фактор транскрипции; IKK — IκB kinase; IRF — interferon regulatory factor; JAK — just another kinase или Janus kinase; JNK — С-Jun N-terminal kinase; MAP — mitogen-activated protein; M1 и M2 — фенотипы макрофагов; МНС — молекулы главного комплекса гистосовместимости; NO — оксид азота; PI3K — фосфатидилинозитол-3-киназа; PIP3 — фосфатидилинозитол 3,4,5-трифосфат; PPAR — peroxisome proliferator-activated receptor; RF-M1 — reprogramming factor M1; RF-M2 — reprogramming factor M2; SOCS1 — suppressor of cytokine signaling; STAT — signal transducers and activators of transcription; TAK1 — TGF-β activated kinase 1; TGF-β — трансформирующий фактор β; TLR — Toll-like receptor; TNF — tumor-necrosis factor

Введение

Выживание человека, как индивида, так и вида в целом, зависит от эффективности иммунной защиты. Эффективность иммунной защиты в свою очередь зависит от того, насколько иммунная система пластична, т.е. насколько быстро и адекватно она может менять свою функциональную активность в зависимости от макро- и микроокружения и действующих патогенных микробов. Ключевую роль в способности иммунитета адекватно реагировать на патогенные факторы играют тканевые резидентные макрофаги. Среди всех иммунных клеток, макрофаги являются самыми пластичными [1]. В зависимости от микроокружения и типа инфекции тканевые макрофаги могут быстро менять свой функциональный фенотип с провоспалительного M1 на противовоспалительный M2 и обратно [2; 3]. Процесс смены функционального фенотипа тканевых макрофагов обозначается термином «репрограммирование». Этот процесс играет центральную роль в иммунном ответе и поэтому его нарушение провоцирует развитие разных болезней [4].

Репрограммирование макрофагов сопровождается формированием нескольких биологических феноменов. Это:

1. Феномен усиления ответа макрофагов как на репрограммирующий фактор (прямое усиление), так и на другой фактор (перекрестное усиление). Например, репрограммирование с помощью IFN-γ усиливает последующий ответ макрофагов как на сам IFN-γ (прямое усиление), так и на ЛПС (перекрестное усиление).

2. Феномен реципрокного подавления альтернативного фенотипа. Существо феномена состоит в том,

что репрограммирование в сторону M1 не только усиливает продукцию воспалительных цитокинов, но также подавляет продукцию анти-воспалительных цитокинов, и возможность формирования M2 фенотипа, и наоборот.

3. Феномен каскадной активации механизмов репрограммирования обеспечивает очень быстрое формирование нужного фенотипа макрофагов.

4. Феномен положительных и обратных связей в механизмах репрограммирования. Механизмы положительной обратной связи обеспечивают быстрое формирование нужного функционального фенотипа макрофагов, например, провоспалительного M1 фенотипа при необходимости иммунного ответа уничтожить патогенный вирус, бактерию или опухолевую клетку. Механизмы отрицательной обратной связи предупреждают чрезмерную неадекватную активацию функционального фенотипа, которая, в случае репрограммирования M1 фенотипа, может привести к неконтролируемому воспалению, повреждению здоровых тканей и развитию провоспалительных заболеваний.

Репрограммирование макрофагов и формирование этих феноменов обеспечивают разные внутриклеточные сигнальные пути, такие, как JNK (С-Jun N-terminal kinase)-, PI3K (фосфатидилинозитол-3-киназа)/Akt-, Notch-, JAK(just another kinase)/STAT (signal transducers and activators)-, TGF-β (трансформирующий фактор β)/SMAD-/nonSMAD-, TLR (Toll-like receptor)/NF-κB- и гипоксия-зависимые пути [5; 6]. Анализ сигнальных путей репрограммирования выявил несколько ключевых особенностей их организации.

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

Во-первых, существует относительная специализация сигнальных путей репрограммирования макрофагов на действие разных компонентов микроокружения. Например, факторы роста, жирные кислоты и лиганды рецепторов, сопряженных с G белками, репрограммируют макрофаги с помощью JNK-зависимого пути, а микробная инвазия, точнее патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (ПАМП), репрограммирует макрофаги, с помощью TLR-, PI3K/Akt- и Notch-зависимых путей.

Во-вторых, сигнальные пути репрограммирования макрофагов можно разделить на две группы: пути, которые преимущественно программируют M1 фенотип, например, JAK/STAT1- и NIF1-пути и пути, которые преимущественно программируют M2 фенотип, например, TGF- β /SMAD- и NIF2- пути.

В-третьих, сигнальные пути, которые передают сигнал от факторов репрограммирования макрофагов на M1 фенотип (RF-M1) и программируют провоспалительный M1 фенотип макрофагов, часто имеют ответвление, которое при его активации может увеличить продукцию противовоспалительных M2 цитокинов; и наоборот. Например, JNK-зависимые пути активируют факторы транскрипции M1 фенотипа, но могут активировать и фактор транскрипции M2 генов — SMAD3, а PI3K/Akt-зависимый путь через Akt2 программирует M1 фенотип, а через Akt1 — M2 и т.д. Биологический смысл такой конструкции сигнальных путей в том, чтобы предупредить избыточное воспаление и повреждение тканей при формировании M1 фенотипа (при необходимости уничтожить вирус или бактерию) или предупредить значительное снижение бактерицидной активности макрофагов и возможность развития аутоиммунных процессов при формировании M2 фенотипа (при необходимости уничтожить внеклеточных паразитов).

Сигнальные внутриклеточные пути играют исключительно важную, но как оказалось не единственную роль в репрограммировании макрофагов. Сигнальные пути могут активировать или ингибировать механизмы других уровней регуляции активности клетки и ее фенотипа, а именно: эпигенетические, посттранскрипционные и метаболические механизмы. Анализу этих механизмов репрограммирования макрофагов посвящен этот обзор.

1. Эпигенетические механизмы репрограммирования макрофагов

Эпигенетические механизмы — это механизмы, которые контролируют модификацию гистонов и других белков хроматина, которые активируют или блокируют экспрессию генов.

1.1. Формы эпигенетической модификации гистонов

Эти механизмы основаны на реакциях ацетилирования, метилирования и фосфорилирования. Благодаря этим реакциям эпигенетические механизмы контролируют взаимодействие промоторов генов с факторами транскрипции [7] и играют важную роль в репрограммировании фенотипа макрофагов [8].

Ацетилированные гистоны распознаются BET (bromodomain and extracellular domain) белками. Такое распознавание стимулирует транскрипционную элонгацию с помощью РНК полимеразы II [9]. Белки, которые распознают ацетилированные гистоны представляют большой интерес в качестве терапевтических мишеней. Так, было синтезировано соединение I-BET, которое препятствовало распознаванию ацетилированных гистонов BET белками. Благодаря этому I-BET препятствовал активации M1 генов в ЛПС-активированных макрофагах и защищал мышью от эндотоксического шока и сепсиса [10].

Метилирование, которое влияет на репрограммирование макрофагов происходит в форме:

- а) триметилирования гистона 3 на лизине 9 (H3K9), лизине 27 (H3K27) и лизине 79 (H3K79), которое подавляет транскрипцию генов;
- б) одновременных активирующих (H3K4me3 и 14-Ac) и репрессивных гистоновых модификаций (H3K9me3 и H3K27me3), которые формируют промежуточный транскрипционный статус;
- в) триметилирования гистона 3 на лизине 4 (H3K4), которое активирует транскрипцию гена [8; 11].

1.2. Сигнальные пути, контролирующие эпигенетические механизмы репрограммирования

Было показано, что в ответ на действие лигандов TLR фактор транскрипции PU.1 и C/EBP- открывают регуляторные регионы промоторов M1 генов, таких, как TNF-, IL-1 β , IL-6, IL-12p40 и CXCL10. TLR-зависимый сигнальный путь, также способствует диссоциации репрессоров от генных локусов. Благодаря этому деметилазы, такие как JMJD3, JMJD2d, PHF2 и AOF1 удаляют негативные метильные группы с гистонов [12; 13] и таким образом делают возможным транскрипцию генов, вовлеченных в M1 репрограммирование. Было показано, что препараты, которые ингибировали JMJD3 деметилазу (junonji H3K27) и родственные деметилазы подавляли продукцию ЛПС-индуцированных воспалительных M1 цитокинов в человеческих макрофагах [14].

Метилирование гистонов также контролируется содержанием кислорода. Так, в макрофагах, гипоксия приводит к угнетению активности junonji гистоновых

деметилаз, приводя к накоплению репрессивных метильных меток (H3K9me2/me3) и ингибированию генов кемокина Ccl2 и кемокиновых рецепторов Ccr1 и Ccr5 [15], вовлеченных в репрограммирование макрофагов.

В ремоделирование хроматина, помимо TLR- и гипоксия-зависимых сигнальных систем, могут быть вовлечены IFN-γ-зависимые сигнальные пути репрограммирования. Так было показано, что IFN-γ — фактор репрограммирования макрофагов на M1 фенотип, через активацию STAT1 запускает эпигенетическую перестройку хроматина, которая способствует активации экспрессии M1 генов [16]. Напротив, IL-4 — фактор репрограммирования макрофагов на M2 фенотип, через IRF4, индуцируя увеличение активности деметилаз JMJD3, модифицирует хроматин так, что экспрессия M2 генов облегчается, а M1 генов затрудняется [17; 18].

1.3. Ключевые положения и выводы об эпигенетических механизмах репрограммирования макрофагов

Во-первых, эпигенетические механизмы, также, как и сигнальные, можно разделить на механизмы репрограммирования M1 фенотипа и механизмы репрограммирования M2 фенотипа. Так, M1 репрограммированию фенотипа макрофагов способствует ацетилирование гистонов, распознаваемое BET белками при ЛПС-зависимом репрограммировании, удаление негативных метильных групп с гистонов с помощью деметилаз также при ЛПС-зависимом репрограммировании и STAT1-индуцированная модификация хроматина при IFN-γ-зависимом репрограммировании. M2 репрограммированию способствует накопление негативных метильных меток на гистонах, обусловленное снижением активности гистоновых деметилаз при гипоксическом репрограммировании и

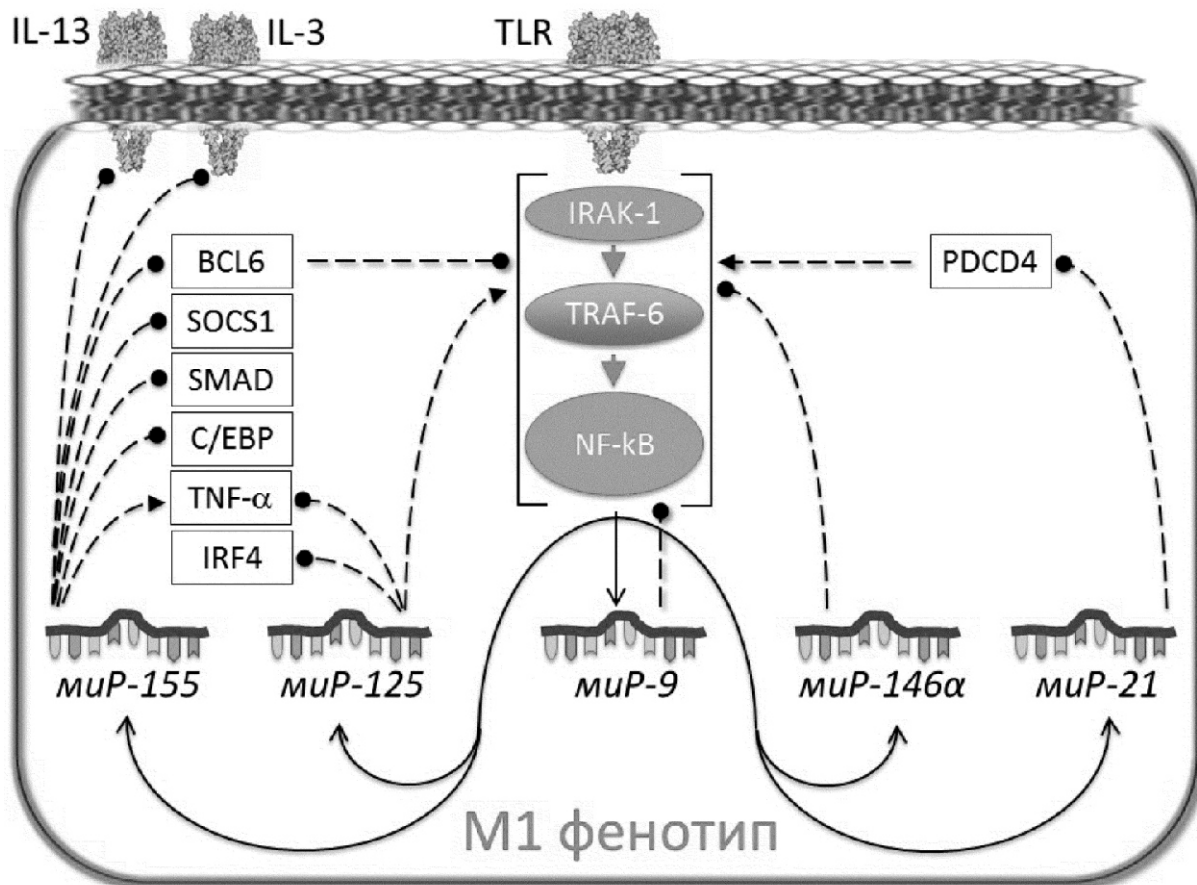


Рис. 1. Набор миРов, синтез которых увеличивается при действии M1 репрограммирующих факторов и миР-зависимые механизмы формирования M1 фенотипа:

миР — микроРНК; TNF — tumor-necrosis factor; IRF — interferon regulatory factor; C/EBPβ — CAAT/enhancer-binding proteins β; SOCS1 — suppressor of cytokine signaling; BCL6 — B-cell CLL/lymphoma 6 (протоонкоген); SMAD — фактор транскрипции; NF-κB — nuclear factor; TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor-6); IRAK-1 (IL-1R associated kinase); PDCD4- programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor); TLR — Toll-like receptor; IL-13 — Interleukin13.

IRF4-индуцированная JMJD3-зависимая модификация хроматина при IL-4-опосредованном репрограммировании.

Во-вторых, эпигенетические механизмы могут быть сопряжены с активацией сигнальных путей репрограммирования и опосредовать действие внешних репрограммирующих факторов. Это сопряжение отражает феномен каскадной активации механизмов репрограммирования.

2. Посттранскрипционные механизмы репрограммирования макрофагов

Ключевым элементом посттранскрипционной регуляции многих клеточных процессов, включая репрограммирование макрофагов, являются микроРНК (миР) [19]. МиРы представляют собой небольшие некодирующие молекулы РНК длиной 18—25 нуклеотидов. Они регулируют синтез белка через связы-

вание с мРНК. Связывание миР с мРНК ингибирует трансляцию белка [20]. Каждая отдельная миР может контролировать несколько мРНК. Кроме того, миР может взаимодействовать с ДНК в процессе РНК-зависимого метилирования ДНК, которое является одним из ключевых механизмов репрессии генов [21].

2.1. M1-репрограммирующие факторы, экспрессия специфического набора миРов и их эффекты на фенотип макрофагов

В человеческих и мышинных макрофагах, факторы репрограммирования активируют синтез специфических наборов миРов (рис. 1 и 2), которые дальше контролируют активацию макрофагов и баланс про- и противовоспалительных процессов. Так, RF-M1 через TLR индуцируют синтез миР-155, миР-21, миР-125, миР-9 и миР-146, а RF-M2 через глюкокортикоидный рецептор — миР-511, через рецептор IL-10 — миР-187 и через рецептор IL-4 — миР-378 [5; 22].

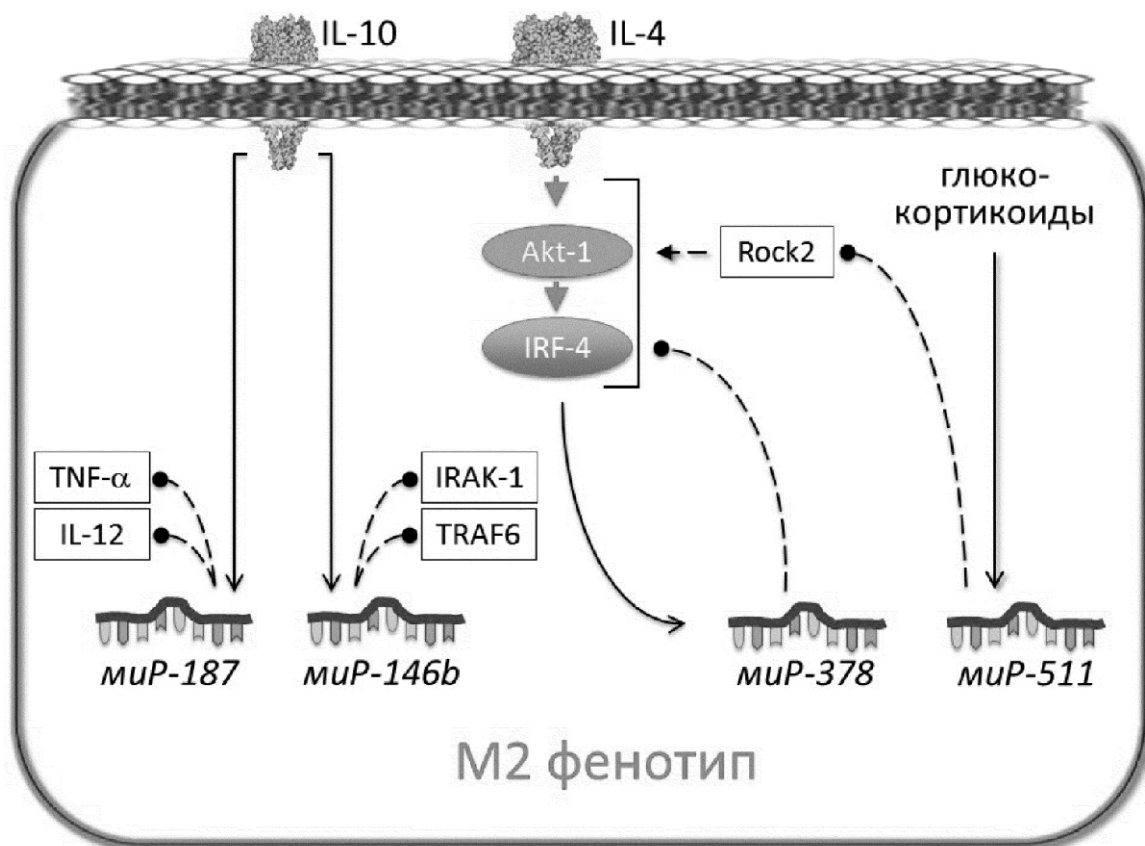


Рис. 2. Набор миРов, синтез которых увеличивается при действии M2 репрограммирующих факторов и миР-зависимые механизмы формирования M2 фенотипа:

миР — микроРНК; Akt — протеинкиназаВ (PKB); IRF4 — interferon regulatory factor; TNF — tumor-necrosis factor; IL12 — Interleukin12; IL10 — Interleukin10; IL4 — Interleukin4; IRAK1 — (IL-1R associated kinase); TRAF6 — (tumor necrosis factor receptor-associated factor-6); Rock2 — Rho-associated, coiled-coil, containing белок киназы 2.

Линии с окончанием в виде стрелки показывают активирующие влияния, а линии с окончанием в виде черного круга — ингибирующие.

Из всех миРов, синтез которых увеличивается при действии провоспалительных лигандов TLR, наиболее изученной оказалась миР-155 (рис. 1). МиР-155 увеличивает стабильность TNF- транскрипта [23], способствует развитию антивирусного иммунитета посредством снижения SOCS1 [24], блокирует рецепторы IL-13 [25] и IL-3 [26], блокирует фактор транскрипции SMAD2 и таким образом снижает M2-репрограммирующий эффект TGF- β [27], но также способствует развитию атеросклероза посредством блокирования трансляции фактора транскрипции BCL6, который угнетает провоспалительный NF- κ B-зависимый сигналинг [28].

Кроме того, мишенью миР-155 является фактор транскрипции C/EBP- β , который регулирует продукцию цитокинов [29]. Блокируя C/EBP- β миР-155 снижает продукцию IL-10, цитокина, который способствует M2 репрограммированию макрофагов. Было показано, что миР-155 может сдвигать M2 фенотип TAM в сторону M1 и таким образом усиливать антиопухольные свойства макрофагов [30].

Таким образом, миР-155 способствует формированию M1 фенотипа.

Формированию M1 фенотипа также способствуют, индуцируемые с TLR миР-29b и миР-125, которые увеличивают провоспалительный NF- κ B сигналинг [31; 32] и блокирует передачу сигнала с рецептора IL-4 на уровне IRF4 [33] (рис. 1). Вместе с тем миР-125a и b могут снижать стабильность TNF-транскрипта [34].

Другие миРы, индуцируемые в макрофагах с TLR при действии RF-M1, такие как миР-146a [35], миР-9 [36], миР-21 [37], и миР-147 [38], играют роль негативных регуляторов M1 репрограммирования макрофагов (рис. 1). Негативный эффект миР-146a связан с тем, что он блокирует IRAK-1 и TRAF6 в TLR- сигнальном пути [35]. Было показано, что этот негативный эффект миР-146a на TLR-индуцируемое воспаление играет важную роль в формировании толерантности макрофагов к ЛПС [39]. МиР-9 прямо [36], а миР-21 опосредованно через PDCD4 [37] подавляют провоспалительную активность NF- κ B.

Таким образом, индуцируемые с TLR миРы формируют регуляторную сеть, в конструкции которой четко различимы два функциональных контура (рис. 1):

1) механизм положительной обратной связи, который формируют миР-155 и миР-125 и который обеспечивает быстрое формирование M1 фенотипа с целью уничтожения инфекции;

2) механизм отрицательной обратной связи, который формируют миР-146a, миР-9, миР-21 и миР-147 и который, вероятно, призван ограничивать избыточное воспаление и повреждение тканей при иммунном ответе на инфекцию.

В M1 фенотипе также обнаружено увеличение миР-29b и миР-29b-1 [32]. Однако механизмы их влияния на фенотип макрофага еще недостаточно четко определены.

2.2. M2-репрограммирующие факторы, экспрессия специфического набора миРов и их эффекты на фенотип макрофагов

RF-M2 индуцируют в макрофагах другой набор миРов (рис. 2). Так, миР-187, синтез которого увеличивается при действии IL-10, содействует завершению воспаления посредством прямого действия на транскрипты TNF- и IL-12p40 [40]. Другой миР, синтез, которого увеличивается в ответ на стимуляцию M2 цитокина IL-10, миР-146b угнетает продукцию провоспалительных цитокинов действуя на ключевые элементы TLR пути [41].

IL-4 увеличивает экспрессию миР-378 [42]. МиР-378 располагается в первом интроне PPAR- γ гена и коэкспрессируется вместе с этим M2 геном, но действует как негативный регулятор M2 ответов, поскольку блокирует IL-4/PI3K/Akt сигнальный путь [42].

МиР-511 располагается в пятом интроне гена мазнозного рецептора (CD206) и коэкспрессируется в ответ на действие глюкокортикоидов в M2 макрофагах. МиР-511-3p нарушает трансляцию Rock2, фактора, который способствует M2 репрограммированию макрофагов за счет фосфорилирования IRF4 [43]. Таким образом, так же, как и миР-378, миР-511, является негативным регулятором противовоспалительного M2 ответа макрофагов.

Таким образом, индуцируемые RF-M2 с разных рецепторов миРы формируют регуляторную сеть, в конструкции которой также четко можно различить два функциональных контура (рис. 2):

1) механизм положительной обратной связи, который формируют миР-187 и миР-146b, который обеспечивает быстрое формирование M2 фенотипа с целью уничтожения паразитарной инфекции и репарации поврежденных тканей, а также предупреждения избыточного воспаления, индуцируемого вирусами и бактериями;

2) механизм отрицательной обратной связи, который формируют миР-378, миР-511, который ограничивает значительное снижение бактерицидной и антивирусной активности иммунитета при развитии Th2 ответа.

В M2 фенотипе макрофагов также увеличивается экспрессия миР-222, миР-27a, миР-125a-3p и миР-125a-5p. Показано, что они также могут влиять на продукцию цитокинов [32].

В целом, сложная внутриклеточная сеть миРов обладает всеми признаками регуляторного механизма

репрограммирования макрофагов, с наличием положительных и отрицательных обратных связей, специфичностью действия на рецепторы и ключевые внутриклеточные белки, которые участвуют в репрограммировании.

2.3. Ключевые положения и выводы о посттранскрипционных механизмах репрограммирования макрофагов

В целом, в отношении мiP-зависимой регуляции репрограммирования макрофагов можно сделать несколько обобщений.

1. Существует определенная специфичность в экспрессии мiPов на M1- и M2-репрограммирующие стимулы: на M1-стимулы экспрессируются мiP-155, мiP-21, мiP-29b, мiP-125, мiP-9 и мiP-146a и мiP-147, а на M2-стимулы — мiP-146b, мiP-511, мiP-187 и мiP-378 мiP-222, мiP-27a, мiP-125a-3p и мiP-125a-5p.

2. И мiPы, которые экспрессируются на M1-репрограммирующие факторы, и мiPы, которые экспрессируются на M2-репрограммирующие факторы, могут формировать механизмы положительной обратной связи для обеспечения быстрого репрограммирования фенотипа макрофагов, так и механизмы отрицательной обратной связи, для ограничения чрезмерного воспаления, в случае формирования M1 фенотипа, а в случае формирования M2 фенотипа ограничения значительного падения бактерицидной, противоопухолевой и противовирусной активности.

3. Понимание функций мiPов позволяет объяснить механизмы феноменов репрограммирования макрофагов.

Роль мiPов в феномене усиления ответа репрограммированных макрофагов сводится к тому, что они формируют положительную обратную связь, которая усиливает последующий ответ репрограммированных макрофагов. Например, мiP-155, экспрессия которого запускается с TLR через NF-κB блокирует трансляцию VCL6, который угнетает провоспалительный NF-κB-зависимый сигналинг [31]. Понятно, что при заблокированном VCL6 ответ репрограммированного макрофага на лиганды TLR будет сильнее.

Вклад мiPов в феномен редипрокнутого подавления альтернативного фенотипа определяется тем, что мiP, участвующий в формировании того или иного фенотипа макрофага может подавлять сигнальные пути формирования альтернативного фенотипа. Так, например, мiP-155, который участвует в формировании M1 фенотипа, блокирует сигнальные пути M2 фенотипа, а именно блокирует рецепторы IL-13, [25] и IL-3 [16], блокирует факторы транскрипции M2 фенотипа SMAD2 [27] и C/EBP-β [44].

МiPы вовлечены в феномен каскадной активации механизмов репрограммирования, благодаря тому, что синтез многих мiPов усиливается при активации цитокин-зависимых путей репрограммирования, как, например, это происходит, когда IL-10 увеличивает синтез мiP-146b.

3. Метаболическая регуляция репрограммирования макрофагов

Было установлено, что репрограммирование фенотипа макрофагов и изменение внутриклеточного метаболизма этих клеток оказывают друг на друга влияние [45].

3.1. Влияние фенотипа макрофагов на клеточный метаболизм

При репрограммировании макрофагов, наиболее хорошо изучены изменения метаболизма аргинина. В M1 фенотипе макрофагов аргинин катаболизируется индуцибельной NOS и в результате увеличивается синтез NO, тогда как в M2 фенотипе увеличенный синтез аргиназы 1 переключает метаболизм аргинина на продукцию мочевины, которая необходима для синтеза коллагена [46]. Установлено, что ответственным за увеличения синтеза аргиназы 1 в M2 макрофагах является тирозин-киназный рецептор Ron [47].

M1 и M2 фенотипы клеток сильно отличаются по способу производства энергии: в M1 макрофагах АТФ синтезируется в основном с помощью гликолиза, тогда как в M2 макрофагах — с помощью окислительного фосфорилирования [44]. Для того, чтобы обеспечить окислительное фосфорилирование достаточным количеством субстратов, в M2 макрофагах увеличена способность захватывать жирные кислоты [44]. Эти данные демонстрируют связь между воспалением и ожирением, и позволяют понять почему провоспалительный M1 фенотип макрофагов способствует развитию метаболического синдрома. Это связано с тем, что способность захватывать и утилизировать жирные кислоты у M1 макрофагов жировой ткани при ожирении существенно снижена, по сравнению с M2 фенотипом жировой ткани нормального организма [44].

Жирные кислоты имеют прямой эффект на репрограммирование макрофагов, потому что сенсоры жирных кислот PPAR-γ и PPAR-δ вовлечены в регуляцию экспрессию генов M2 фенотипа [48; 49].

Наконец, разные фенотипы макрофагов по-разному регулируют метаболизм железа [50]. В M1 макрофагах увеличена экспрессия генов, контролирующих захват и депонирование бактериостатического железа, тогда как в M2 макрофагах благодаря увеличенной экспрессии гемовых рецепторов (CD163, CD91,

heme carrier protein 1) происходит усиленный захват гемового железа. В M2 макрофагах гемовое железо катаболизируется с помощью heme oxygenase 1 до CO, биливердин/билирубина [51] и свободного железа, который затем экспортируется из клетки. Метаболизм железа в M2 макрофагах не только позволяет удалять токсичные молекулы гема из окружающей среды, что согласуется с функцией «чистильщика» M2 макрофагов, но также обеспечивает вклад в формирование противовоспалительных свойств и механизмов тканевой репарации у этого фенотипа макрофагов. Так, различная экспрессия молекул, вовлеченных в метаболизм железа, влияет как на внутриклеточную доступность железа, так и на взаимодействие макрофагов с паренхимальными клетками. Сниженная внутриклеточная биодоступность железа в M2 макрофагах негативно влияет на активность NF-κB и трансляцию TNF-α и IL-6 [52]. С другой стороны, увеличенная доступность железа в экстраклеточной среде, поддерживаемая M2 макрофагами, оказывает влияние на скорость роста фибробластов и таким образом содействует биосинтезу коллагена во время восстановительных процессов [53].

3.2. Влияние клеточного метаболизма на фенотип макрофагов

Влияние функционального фенотипа макрофагов на клеточный метаболизм не является односторонним, изменение метаболизма также существенно влияет на фенотип клеток. Так, например, как указано выше, M2 макрофаги увеличивают способность захватывать жирные кислоты [44]. Далее выяснилось, что жирные кислоты могут оказывать противоположные эффекты на формирование функционального фенотипа макрофагов. С одной стороны, жирные кислоты, действуя на PPAR-γ и PPAR-δ могут блокировать активность JNK (активатор генов M1 фенотипа), и таким образом способствовать формированию M2 фенотипа [24; 48], а с другой стороны, через активацию MLK3 (mixed-lineage kinase 3) могут активировать JNK, и благодаря этому, репрограммировать макрофаги на M1 фенотип [37; 54].

Действие жирных кислот на PPAR-γ и PPAR-δ отражает формирование положительной обратной связи в формировании M2 фенотипа и вероятно представляет собой компенсаторную реакцию нормальных макрофагов на увеличение концентрации жирных кислот. Действие жирных кислот на MLK3 и активация JNK, отражает формирование отрицательной обратной связи, которая предупреждает значительное снижение бактерицидных и противовирусных свойств M2 фенотипа нормальных макрофагов. Однако в условиях ожирения и больших концентраций жирных кислот, особенно насыщенных, MLK3/JNK-за-

висимый путь, вероятно, может привести к формированию патогенетического провоспалительного M1 фенотипа макрофагов жировой ткани и способствовать развитию инсулинорезистентности [55].

Есть большое количество данных о влиянии измененного гипоксией метаболизма на репрограммирование макрофагов [56, 57]. В этом случае макрофаги приобретают M1 фенотип, если их активирует фактор транскрипции HIF-1, или M2 — если HIF-2.

3.3. Ключевые положения и выводы о механизмах метаболической регуляции репрограммирования макрофагов

1. Репрограммирование макрофагов приводит не только к изменению функциональных свойств, но и метаболизма этих клеток.

Формирование M1 фенотипа сопровождается сдвигом метаболизма аргинина в сторону активации NO-синтазы и увеличения продукции NO, увеличением вклада гликолиза в продукцию АТФ, увеличением захвата и депонирования бактериостатического железа. Формирование M2 фенотипа сопровождается сдвигом метаболизма аргинина в сторону активации аргиназы 1 и увеличения продукции мочевины, увеличением синтеза АТФ за счет окислительного фосфорилирования и увеличенного захвата жирных кислот, увеличением захвата гемового железа.

2. Изменение метаболизма существенно влияет на репрограммирование функционального фенотипа макрофагов.

Метаболический контроль фенотипа макрофагов может осуществляться благодаря формированию положительных и отрицательных обратных связей. Например, положительная обратная связь формируется, когда увеличение концентрации жирных кислот через PPAR-γ и PPAR-δ блокирует активность JNK, и таким образом способствует формированию M2 фенотипа, который имеет повышенную способность к захвату жирных кислот. Отрицательная обратная связь формируется, когда жирные кислоты через MLK3 активируют JNK, и таким образом способствуют формированию M1 фенотипа, который имеет сниженную способность к захвату жирных кислот.

Заключение

В целом становится понятным, что репрограммирование функционального фенотипа макрофагов вовлекает хорошо согласованные между собой изменения активности внутриклеточных сигнальных систем, эпигенетических и посттрансляционных механизмов и изменения метаболизма этих клеток. Нарушение репрограммирования макрофагов играет важную роль в развитии заболеваний. Поэтому, детальное понима-

ние, какие белки, ферменты и мРНК вовлечены в репрограммирование, окажет помощь в выборе терапевтических мишеней при разработке новых эффективных способов коррекции нарушенного иммунитета.

Обзор написан при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Соглашение от 17 июня 2014 г. № 14.604.21.0020, Уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEFI60414X0020).

References

- Martinez-Nunez R.T., Louafi F., Sanchez-Elsner T. The interleukin 13 (IL-13) pathway in human macrophages is modulated by microRNA-155 via direct targeting of interleukin 13 receptor alpha1 (IL-13Ra1). *J Biol Chem.* 2011; 286: 1786-94.
- Benoit M., Desnues B., Mege J.L. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol.* 2008; 181 (6): 3733-9.
- Saccani A., Schioppa T., Porta C., Biswas S.K., Nebuloni M., Vago L. et al. p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. *Cancer Res.* 2006; 66 (23): 11432-40.
- Gordon S., Martinez F.O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 2010; 32 (5): 593-604.
- Locati M., Mantovani A., Sica A. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. *Adv Immunol.* 2013; 120: 163-84.
- Zhou D., Huang C., Lin Z., Zhan S., Kong L., Fang C. et al. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cell Signal.* 2014; 26 (2): 192-7.
- Ivashkiv L.B. Epigenetic regulation of macrophage polarization and function. *Trends Immunol.* 2013; 34 (5): 216-23.
- Medzhitov R., Horng T. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9 (10): 692-703.
- Jang M.K., Mochizuki K., Zhou M., Jeong H.S., Brady J.N., Ozato K. The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell.* 2005; 19 (4): 523-34.
- Nicodeme E., Jeffrey K.L., Schaefer U., Beinke S., Dewell S., Chung C.W. et al. Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature.* 2010; 468 (7327): 1119-23.
- Barski A., Cuddapah S., Cui K., Roh T.Y., Schonnes D.E., Wang Z. et al. High resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell.* 2007; 129 (4): 823-37.
- Stender J.D., Pascual G., Liu W., Kaikkonen M.U., Do K., Spann N.J. et al. Control of proinflammatory gene programs by regulated trimethylation and demethylation of histone H4K20. *Mol Cell.* 2012; 48 (1): 28-38.
- Zhu Y., van Essen D., Saccani S. Cell-type-specific control of enhancer activity by H3K9 trimethylation. *Mol Cell.* 2012; 46 (4): 408-23.
- Kruidenier L., Chung C.W., Cheng Z., Liddle J., Che K., Joberty G. et al. A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. *Nature.* 2012; 488 (7411): 404-8.
- Tausendschon M., Dehne N., Вьне В. Hypoxia causes epigenetic gene regulation in macrophages by attenuating Jumonji histone demethylase activity. *Cytokine.* 2011; 53 (2): 256-62.
- Chen J., Ivashkiv L.B. IFN-gamma abrogates endotoxin tolerance by facilitating Toll-like receptor-induced chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107 (45): 19438-43.
- Satoh T., Takeuchi O., Vandenbon A., Yasuda K., Tanaka Y., Kumagai Y. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat Immunol.* 2010; 11 (10): 936-44.
- Sica A., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012; 122 (3): 787-95.
- Ponomarev E., Veremeyko T., Weiner H. MicroRNAs are universal regulators of differentiation, activation and polarization of microglia and macrophages in normal and diseased CNS. *Glia.* 2013; 61 (1): 91-103.
- Bartel D.P. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009; 136 (2): 215-33.
- Galitskiy V.A. The hypothesis about the mechanism of initiation of small RNA of DNA methylation de novo and allelic exclusion. *Tsitologiya.* 2008; 50 (4): 277-86. (in Russian)
- Mantovani A., Locati M. Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33 (7): 1478-83.
- Bala S., Marcos M., Kodys K., Csak T., Catalano D., Mandrekar P. et al. Up-regulation of microRNA-155 in macrophages contributes to increased tumor necrosis factor alpha (TNF{alpha}) production via increased mRNA half-life in alcoholic liver disease. *J Biol Chem.* 2011; 286 (2): 1436-44.
- Wang P., Hou J., Lin L., Wang C., Liu X., Li D. et al. Inducible microRNA-155 feedback promotes type I IFN signaling in antiviral innate immunity by targeting suppressor of cytokine signaling 1. *J Immunol.* 2010; 185 (10): 6226-33.
- Martinez-Nunez R.T., Louafi F., Sanchez-Elsner T. The interleukin 13 (IL-13) pathway in human macrophages is modulated by microRNA-155 via direct targeting of interleukin 13 receptor alpha1 (IL-13Ra1). *J Biol Chem.* 2011; 286: 1786-94.
- Chen J., Olsen J., Ford S., Mirza S., Walker A., Murphy J.M. et al. A new isoform of interleukin-3 receptor α with novel differentiation activity and high affinity binding mode. *J Biol Chem.* 2009; 284 (9): 5763-73.
- Louafi F., Martinez-Nunez R.T., Sanchez-Elsner T. MicroRNA-155 targets SMAD2 and modulates the response of macrophages to transforming growth factor- β . *J Biol Chem.* 2010; 285 (53): 41328-36.
- Nazari-Jahantigh M., Wei Y., Noels H., Akhtar S., Zhou Z., Koenen R.R. et al. MicroRNA-155 promotes atherosclerosis by repressing Bcl6 in macrophages. *J Clin Invest.* 2012; 122 (11): 4190-202.
- Ramji D.P., Foka P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J.* 2002; 365 (Pt 3): 561-75.
- He M., Xu Z., Ding T., Kuang D.M., Zheng L. MicroRNA-155 regulates inflammatory cytokine production in

tumor-associated macrophages via targeting C/EBPbeta. *Cell Mol Immunol.* 2009; 6 (5): 343-52.

31. Kim S.W., Ramasamy K., Bouamar H., Lin A.P., Jiang D., Aguiar R.C. MicroRNAs miR-125a and miR-125b constitutively activate the NF-kappaB pathway by targeting the tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20). *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109 (20): 7865-70.

32. Graff J.W., Dickson A.M., Clay G., McCaffrey A.P., Wilson M.E. Identifying functional microRNAs in macrophages with polarized phenotypes. *J Biol Chem.* 2012; 287 (26): 21816-25.

33. Chaudhuri A.A., So A.Y., Sinha N., Gibson W.S., Taganov K.D., O'Connell R.M. et al. MicroRNA-125b potentiates macrophage activation. *J Immunol.* 2011; 187 (10): 5062-8.

34. Tili E., Michaille J.J., Cimino A., Costinean S., Dumitru C.D., Adair B. et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol.* 2007; 179 (8): 5082-9.

35. Taganov K.D., Boldin M.P., Chang K.J., Baltimore D. NF-kappaB dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103 (33): 12481-6.

36. Bazzoni F., Rossato M., Fabbri M., Gaudiosi D, Mirollo M, Mori L. et al. Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to pro-inflammatory signals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106 (13): 5282-7.

37. Sheedy F.J., Palsson-McDermott E., Hennessy E.J., Martin C., O'Leary J.J., Ruan Q. et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat Immunol.* 2010; 11 (2): 141-7.

38. Liu G., Friggeri A., Yang Y., Park Y.J., Tsuruta Y., Abraham E. miR-147 a microRNA that is induced upon Toll-like receptor stimulation regulates murine macrophage inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106 (37): 15819-24.

39. Nahid M.A., Pauley K.M., Satoh M., Chan E.K. miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: Implication in innate immunity. *J Biol Chem.* 2009; 284 (50): 34590-9.

40. Rossato M., Curtale G., Tamassia N., Castellucci M, Mori L, Gasperini S. et al. IL-10-induced microRNA-187 negatively regulates TNF-alpha, IL-6, and IL-12p40 production in TLR4-stimulated monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109 (45): E3101-10.

41. Curtale G., Mirollo M., Renzi T.A., Rossato M., Bazzoni F., Locati M. Negative regulation of toll-like receptor 4 signaling by the IL-10 dependent microRNA-146b. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110 (28): 11499-504.

42. Rossato M., Curtale G., Tamassia N., Castellucci M., Mori L., Gasperini S. et al. Induction of IL-4Ralpha-dependent microRNAs identifies PI3K/Akt signaling as essential for IL-4-driven murine macrophage proliferation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109 (45): E3101-10.

43. Squadrito M.L., Etzrodt M., De Palma M., Pittet M.J. MicroRNA-mediated control of macrophages and its implications for cancer. *Trends Immunol.* 2013; 34 (7): 350-9.

44. Odegaard J.I., Chawla A. Alternative macrophage activation and metabolism. *Annu Rev Pathol.* 2011; 6: 275-97.

45. O'Neill L.A., Hardie D.G. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature.* 2013; 493 (7432): 346-55.

46. Modolell M., Corraliza I.M., Link F., Soler G., Eichmann K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol.* 1995; 25 (4): 1101-4.

47. Sharda D.R., Yu S., Ray M., Squadrito M.L., De Palma M., Wynn T.A. et al. Regulation of macrophage arginase expression and tumor growth by the Ron receptor tyrosine kinase. *J Immunol.* 2011; 187 (5): 2181-92.

48. Kang K., Reilly S.M., Karabacak V., Gangl M.R., Fitzgerald K, Hatano B. et al. Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab.* 2008; 7 (6): 485-95.

49. Odegaard J.I., Ricardo-Gonzalez R.R., Goforth M.H., Morel C.R., Subramanian V., Mukundan L. et al. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature.* 2007; 447 (7148): 1116-20.

50. Recalcati S., Locati M., Marini A., Santambrogio P., Zaninotto F., De Pizzol M. et al. Differential regulation of iron homeostasis during human macrophage polarized activation. *Eur J Immunol.* 2010; 40 (3): 824-35.

51. Cairo G., Recalcati S., Mantovani A., Locati M. Iron trafficking and metabolism in macrophages: contribution to the polarized phenotype. *Trends Immunol.* 2011; 32 (6): 241-7.

52. Wang L., Johnson E.E., Shi H.N., Walker W.A., Wessling-Resnick M., Cherayil B.J. Attenuated inflammatory responses in hemochromatosis reveal a role for iron in the regulation of macrophage cytokine translation. *J Immunol.* 2008; 181 (4): 2723-31.

53. Saclier M., Yacoub-Youssef H., Mackey A.L., Arnold L., Ardjoune H., Magnan M. et al. Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration. *Stem Cells.* 2013; 31 (2): 384-96.

54. Gadang V., Kohli R., Myronovych A., Hui D.Y., Perez-Tilve D., Jaeschke A. MLK3 promotes metabolic dysfunction induced by saturated fatty acid-enriched diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013; 305 (4): E549-56.

55. Han M.S., Jung D.Y., Morel C., Lakhani S.A., Kim J.K., Flavell R.A. et al. JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation. *Science.* 2013; 339 (6116): 218-22.

56. Manukhina E.B, Goryacheva A.V., Malyshev I.Yu., Dauni G.F. The role of process of nitric oxide in the development of Alzheimer's disease and its prevention with the help of adaptation to hypoxia. *Patogenez.* 2013; 11 (1): 27-35. (in Russian).

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

Received 30.06.15

Никифоров Н.Г.^{1,2,3}, Корниенко В.Ю.¹, Карагодин В.П.⁴, Орехов А.Н.^{1,3}

Активация макрофагов при атеросклерозе. Сообщение 1. Активация макрофагов в норме и в атеросклеротическом поражении

¹ — Научно-исследовательский институт атеросклероза», «Инновационный центр Сколково», 143025, Сколково, Московская область, Россия, ул. Новая, д. 100

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

³ — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

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

Макрофаги играют важнейшую роль в инициации и развитии воспалительного процесса при атеросклерозе. Как в атеросклеротических бляшках сосудов у человека, так и в поражениях, индуцированных у мышей, наблюдается неоднородность фенотипа макрофагов. В атеросклеротическом поражении фенотип макрофагов варьирует между двумя пограничными состояниями: M1 (провоспалительный фенотип) и M2 (противовоспалительный фенотип). При атеросклерозе макрофаги проявляют пластичность фенотипа, а также способны быстро реагировать на изменения в микроокружении. В бляшке можно наблюдать несколько фенотипов макрофагов, причем поляризация является обратимой и может быть изменена под влиянием различных факторов. В данной работе рассматривается ряд фенотипов макрофагов: M1, M2, M4, Mhem, HA-mac, M(Hb) и Mox. В статье освещены свойства различных фенотипов, обсуждается способность макрофагов к изменению фенотипа.

Ключевые слова: атеросклероз; макрофаги; моноциты; активация; воспаление; липопротеиды; липиды

Nikiforov N.G.^{1,2,3}, Kornienko V.Y.¹, Karagodin V.P.⁴, Orekhov A.N.^{1,3}

Macrophage activation in atherosclerosis. Message 1: Activation of macrophages normally and in atherosclerotic lesions

¹ — Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Centre, 143025, Skolkovo, Moscow Region, Russia, Novaya street, 100

² — Federal State Institute «Russian Production Complex of Cardiology Research» of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, 121552, Moscow, 3-th Cherepkovskaya street, 15-a

³ — Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia, 125315, Moscow, Baltiyskaya street, 8

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

Macrophages play important role in initiation and progression of inflammation in atherosclerosis. Plaque macrophages were shown to exhibit a phenotypic range that is intermediate between two extremes, M1 (proinflammatory) and M2 (anti-inflammatory). Indeed, in atherosclerosis, macrophages demonstrate phenotypic plasticity to rapidly adjust to changing microenvironmental conditions. In plaque macrophages demonstrate different phenotypes, and besides macrophage phenotypes could be changed. Phenotypes M1, M2, M4, Mhem, HA-mac, M(Hb) and Mox are described in the article. Ability of macrophages change their phenotype also considered.

Key words: atherosclerosis; macrophage; monocyte; activation; inflammation; lipoproteins; lipids

1. Введение

Общепризнано, что атеросклероз сопровождается хроническим воспалением в сосудистой стенке. Макрофаги играют ключевую роль, как на ранних стадиях, так и в последующем развитии атеросклероза. На ранних

этапах моноциты крови мигрируют из просвета сосуда в субэндотелиальное пространство артериальной стенки, где они накапливаются и дифференцируются в макрофаги. Макрофаги поглощают модифицированные липиды, а затем вследствие перегрузки липидами превращаются в проатерогенные пенистые клетки. Пенистые клетки не могут покинуть очаг начального поражения, поэтому они не способны остановить воспалительную реакцию и способствуют прогрессированию процесса.

Для корреспонденции: Никифоров Никита Геннадьевич, аспирант ФГБНУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, e-mail: nikiforov.mipt@googlemail.com

Макрофаги обычно локализованы в очагах атеросклеротического поражения и в кальцинированных участках. Погибшие макрофаги способствуют развитию некротического ядра и обострению проатерогенной воспалительной реакции. Хотя макрофаги в очагах атеросклеротического поражения представляют собой популяцию окончательно дифференцированных моноцитов, они находятся под влиянием различных стимулов, которые могут вызывать в той или иной степени поляризацию макрофагов по провоспалительному пути. В бляшке можно наблюдать несколько фенотипов макрофагов, причем поляризация является обратимой и может быть изменена под влиянием различных факторов [1].

2. Изменение физиологии макрофагов при активации

В процессе кроветворения дифференцировка моноцитов происходит под влиянием факторов, таких как гранулоцитарный-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) и макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), которые приводят к формированию макрофагов, фенотипически сходных с M1 и M2 макрофагами. Классический фенотип M1 индуцируется провоспалительными цитокинами: фактором некроза опухоли альфа (ФНО- α), интерфероном-гамма (ИФН- γ), а также бактериальными компонентами, такими как липополисахариды (ЛПС) и флагеллин, или в ответ на внутриклеточную паразитарную инфекцию. M1 макрофаги экспрессируют широкий спектр цитокинов (ФНО- α , интерлейкин (ИЛ)-1 β , ИЛ-12 и ИЛ-23) и хемокинов (хемокины типа C-X-C (CXCL9, CXCL10, CXCL11)) [2-4]. Такие макрофаги также секретируют и обеспечивают высокий уровень активных форм кислорода (АФК), оксида азота (NO) и участвуют в каскаде иммунного ответа, опосредованного клетками Th1. Противовоспалительный фенотип M2 макрофагов индуцируется цитокинами характерными для клеток Th2. Как правило, макрофаги секретируют большое количество ИЛ-10 и участвуют в ремоделировании ткани, васкулогенезе и развитии опухоли [1, 3].

Тем не менее, система M1/M2 не отражает всю сложность фенотипических подмножеств макрофагов. В зависимости от активирующего стимула, M2 макрофаги могут быть разделены на четыре подгруппы [1, 5]. Макрофаги фенотипа M2a индуцируются ИЛ-4 и ИЛ-13 и экспрессируют высокий уровень CD206, рецептора 2 ИЛ-1 и антагониста рецептора ИЛ-1 (IL1RN). Макрофаги фенотипа M2b индуцируются иммунными комплексами и лигандами толл-подобных рецепторов (TLR). Макрофаги фенотипа M2b продуцируют как про- (ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α), так и противовоспалительные цитокины (ИЛ10). M2c клетки проявляют сильные противовоспалительные свойства и могут быть индуцированы глюкокортикоидами и

ИЛ-10 [3, 5, 6]. M2c макрофаги воздействуют на апоптотические клетки и продуцируют пентаксин-3 и большое количество ИЛ10 и трансформирующего фактора роста (TGF) - β . Они также экспрессируют рецептор киназы Мер (MERTK), играющий важную роль в поддержании эффероцитической функции. Субпопуляция макрофагов M2d индуцируется агонистом TLR через рецептор аденозина A2A (ADORA2A). Затем следует подавление продукции провоспалительных цитокинов, индуцируется продукция ИЛ-10, а также фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF), что обеспечивает проангиогенные свойства макрофагов [7]. Наконец, фенотип макрофагов M4 индуцируется CXCL4, который продуцируется активированными тромбоцитами. M4 макрофаги обладают провоспалительными свойствами, продуцируя ИЛ-6, ФНО- α и матричную мателлопротеиназу MMP12. При этом они теряют скэвенджер рецептры к гемоглобин-гаптоглобину (Hb-Hp) CD163, которые играют важную роль при репарации после кровоизлияния в бляшке. Как следствие, отсутствие CD163 приводит к неспособности активировать антиатерогенную гемоксиназу-1 в ответ на комплекс Hb-Hp, что, в свою очередь, и определяет роль M4 макрофагов в атерогенезе [5, 8—10].

3. Активация макрофагов в очаге атеросклеротического поражения

Как упоминалось выше, популяция макрофагов в очаге атеросклеротического поражения гетерогенна. В бляшках цитокины, хемокины, модифицированные липиды и циркулирующие иммунные комплексы способны модулировать фенотип макрофагов. M1 макрофаги были обнаружены при атеросклеротическом поражении несколько десятилетий назад, в то время как M2 макрофаги были выявлены в очаге поражения относительно недавно. Ранее было изучено распределение M1 и M2 макрофагов в очагах атеросклеротического поражения и показано, что популяция обоих фенотипов макрофагов возрастает при прогрессировании поражения, причем популяции распределены равномерно в районе фиброзной покрывки бляшки [11, 12]. Клеточные маркеры M1 макрофагов были обнаружены преимущественно в подверженных разрывам плечевых участках поражения, тогда как маркеры M2 макрофагов преобладали в адвентиции. Макрофаги M2 были обнаружены также в более стабильных участках поражения вне липидного ядра [13, 14]. В участках с большим количеством M2 макрофагов была обнаружена высокая экспрессия ИЛ-4, цитокина, необходимого для поляризации макрофагов по фенотипу M2. Наблюдаемая популяция макрофагов была более устойчива к образованию пенных клеток и имела повышенную способность к сохранению эфиров холестерина по сравнению с M1 и покоящимися макрофагами.

Было обнаружено, что уровень экспрессии маркеров M1 макрофагов выше в атеросклеротических поражениях сонных артерий, а маркеры M2 макрофагов были преимущественно обнаружены в очагах поражения бедренных артерий [15]. Кроме того, макрофаги M1 проявляют повышенную экспрессию некоторых белков ММР. Таким образом, M1 макрофаги накапливаются преимущественно в симптоматических и нестабильных бляшках [13].

В участках атеросклеротических поражений был обнаружен еще один уникальный фенотип макрофагов, который может проявлять как про- так и противоатерогенные свойства. Была описана новая популяция макрофагов (HA-mac) в геморрагических областях бляшек, которая экспрессировала высокий уровень CD163 и низкий уровень антигена лейкоцитов человека (HLA-DR) [5]. Оказалось, что эта популяция проявляет антиатеросклеротические защитные свойства. Макрофаги взаимодействуют с комплексами Hb-Hp через рецептор CD163 с последующей очисткой гемоглобина и снижением окислительного стресса. Очистка гемоглобина сопровождается продукцией противовоспалительного цитокина ИЛ-10. Гемоглобин обладает антиатерогенными свойствами: предотвращает образование пенистых клеток и активацию ядерного фактора транскрипции Nrf2, который вызывает экспрессию гемоксигеназы 1 [6, 12, 16].

Существует другая популяция макрофагов, называемая Mhem, которая тесно связана с HA-mac и также вовлечена в очистку гемоглобина посредством фагоцитоза эритроцитов. Эта популяция характеризуется высокой экспрессией CD163 и гема-зависимого фактора активации транскрипции (ATF)-1. ATF1 вызывает экспрессию гемоксигеназы 1 и X рецептора печени β (LXR- β). Экспрессия LXR- β приводит к индукции других генов, отвечающих за отток холестерина, таких, как LXR- α и ATF-связанный кассетный транспортер 1 (ABCA-1). Фенотип Mhem характеризуется повышенным оттоком холестерина, связанного с повышенной продукцией ИЛ-10 и Апо-Е. Более того, и Mhem, и HA-mac повышают устойчивость к внутренним кровоизлияниям в бляшках [17, 18].

Употребление макрофагами комплексов Hb-Hp стимулирует активность и увеличивает популяцию M(Hb), что приводит к высокой экспрессии CD163 и MR. Эта популяция также характеризуется повышенной устойчивостью к образованию пенистых клеток, но повышенной продукцией АФК. В совокупности макрофаги Mhem, HA-mac и M(Hb) способны снижать кровоизлияния в бляшках и инфильтрацию эритроцитов. Они также участвуют в утилизации и переработке железа, накопленного в бляшках [17, 19, 20].

У мышей тоже есть M1, M2 и M(Hb) макрофаги, но они также имеют свой уникальный фенотип называемый Mox. Mox макрофаги содержатся в большем коли-

честве в очагах поражения у мышей. Этот фенотип может индуцироваться окисленными фосфолипидами, Mox макрофаги продуцируют высокий уровень гемоксигеназы 1. Mox макрофаги проявляют проатерогенные свойства, продуцируя ИЛ-1 β и АФК [21—23].

Ранее рассмотренные M4 макрофаги потенциально могут играть проатерогенную роль в нестабильных бляшках и могут быть вовлечены в поздние атеросклеротические осложнения, такие, как острый коронарный синдром и артериальный тромбоз, так как M4 макрофаги активируются тромбоцитарным CXCL4. Они продуцируют MMP12, белок, вовлеченный в деградацию фиброзной покрывки и дестабилизацию бляшки. Однако, фактическая роль M4 макрофагов в атеросклерозе не известна [24—26].

4. Выводы

Рассмотренные выше данные свидетельствуют о функциональной пластичности фенотипа макрофагов, который изменяется под влиянием различных факторов. При атеросклерозе были обнаружены макрофаги с различными фенотипами. Однако неясно, как разные фенотипы могут сосуществовать в одной и той же области. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что макрофаги в бляшках проявляют свойства, которые соответствуют промежуточным положениям между фенотипами M1 и M2. Следует отметить, что макрофаги M1, M2, и Mox могут изменять свой фенотип, однако поляризация M4 является необратимой.

Работа проведена при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Министерства образования и науки России (проект RFMEFI61614X0021).

References

- Leitinger N, Schulman IG. Phenotypic polarization of macrophages in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33(6):1 120–6.
- Lovren F, Pan Y, Quan A, Singh KK, Shukla PC, Gupta N, Steer BM, Ingram AJ, Gupta M, Al-Omran M, Teoh H, Marsden PA, Verma S. MicroRNA-145 targeted therapy reduces atherosclerosis. *Circulation.* 2012; 126(11 Suppl 1): S81–90.
- Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, Eagle AR, Vats D, Brombacher F, Ferrante AW, Chawla A. Macrophage-specific ppargamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature.* 2007; 447(7148): 1116–20.
- Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Red Eagle A, Vats D, Morel CR, Goforth MH, Subramanian V, Mukundan L, Ferrante AW, Chawla A. Alternative M2 activation of Kupffer cells by ppardelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab.* 2008; 7960: 496–507.
- Boyle JJ, Harrington NA, Piper E, Elderfield K, Stark J, Landis RC, Haskard DO. Coronary intraplaque hemorrhage evokes a novel atheroprotective macrophage phenotype. *Am J Pathol.* 2009; 174(3): 1097–108. Ishiyama J, Ta-

guchi R, Yamamoto A, Murakami K. Palmitic acid enhances lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1) expression and promotes uptake of oxidized LDL in macrophage cells. *Atherosclerosis*. 2010; 209(1): 118-24.

6. Urtasun R, Cubero FJ, Nieto N. Oxidative stress modulates KLF6Full and its splice variants. *Alcohol Clin Exp Res*. 2012; 36(11): 1851-62. doi: 10.1111/j.1530-0277.2012.01798.x

van Tits LJ, Stienstra R, van Lent PL, Netea MG, Joosten LA, Stalenhoef AF. Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: a crucial role for Kruppel-like factor 2. *Atherosclerosis*. 2011; 214: 345-9.

7. Dhaouadi N, Li JY, Feugier P, Gustin MP, Dab H, Kacem K, Bricca G, Cerutti C. Computational identification of potential transcriptional regulators of TGF- β 1 in human atherosclerotic arteries. *Genomics*. 2014; 103(5-6): 357-70.

8. Chao LC, Soto E, Hong C, Ito A, Pei L, Chawla A, Conneely OM, Tangirala RK, Evans RM, Tontonoz P. Bone marrow NR4A expression is not a dominant factor in the development of atherosclerosis or macrophage polarization in mice. *J Lipid Res*. 2013; 54(3): 806-15.

9. Chen H, Jacobson BA, Mason L, Wolf SF, Bowman MR. FIZZ1 potentiates the carbachol-induced tracheal smooth muscle contraction. *Eur Respir J*. 2010; 36(5): 1165-73.

10. Ghisletti S, Huang W, Ogawa S, Pascual G, Lin ME, Wilson TM, Rosenfeld MG, Glass CK. Parallel sumoylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPAR γ . *Mol Cell*. 2007; 25(1): 57-70.

11. Feig JE, Rong JX, Shamir R, Sanson M, Vengrenyuk Y, Liu J, Rayner K, Moore K, Garabedian M, Fisher EA. HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(17): 7166-71.

12. Stüger JL, Gijbels MJ, van der Velden S, Manca M, van der Loos CM, Biessen EA, Daemen MJ, Lutgens E, de Winther MP. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2012; 225: 461-68.

13. Chinetti-Gbaguidi G, Baron M, Bouhrel MA, Vanhoutte J, Copin C, Sebti Y, Derudas B, Mayi T, Bories G, Tailleux A, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Staels B. Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPAR γ and LXRA pathways. *Circ Res*. 2011; 108(8): 985-95.

14. Feig JE, Rong JX, Shamir R, Sanson M, Vengrenyuk Y, Liu J, Rayner K, Moore K, Garabedian M, Fisher EA. HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(17): 7166-71.

15. Kansanen E, Bonacci G, Schopfer FJ, Kuosmanen SM, Tong KI, Leinonen H, Woodcock SR, Yamamoto M, Carlberg C, Yla-Herttuala S, Freeman BA, Leinonen AL. Electrophilic nitro-fatty acids activate NRF2 by a KEAP1 cysteine 151-independent mechanism. *J Biol Chem*. 2011; 286(16): 14019-27.

16. Spann NJ, Garmire LX, McDonald JG, Myers DS, Milne SB, Shibata N, Reichart D, Fox JN, Shaked I, Heu-

dobler D et al. Regulated accumulation of desmosterol integrates macrophage lipid metabolism and inflammatory responses. *Cell*. 2012; 151(1): 138-52.

17. Boyle JJ. Heme and haemoglobin direct macrophage Mhem phenotype and counter foam cell formation in areas of intraplaque haemorrhage. *Curr Opin Lipidol*. 2012; 23(5): 453-61.

18. Urtasun R, Cubero FJ, Nieto N. Oxidative stress modulates KLF6Full and its splice variants. *Alcohol Clin Exp Res*. 2012; 36(11): 1851-62. doi: 10.1111/j.1530-0277.2012.01798.x

19. Rader DJ. Molecular regulation of HDL metabolism and function: Implications for novel therapies. *J Clin Invest*. 2006; 116(12): 3090-100.

20. Ribas V, Drew BG, Le JA, Soleymani T, Daraei P, Sitz D, Mohammad L, Henstridge DC, Febbraio MA, Hewitt SC, Korach KS, Bensinger SJ, Hevener AL. Myeloid-specific estrogen receptor alpha deficiency impairs metabolic homeostasis and accelerates atherosclerotic lesion development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(39): 16457-62.

21. Grover V, Malhotra R, Kapoor A, Singh J, Sachdeva S. Proresolution mediators and receptors: novel drug targets for enhancing pharmacological armamentarium against periodontal inflammation. *Infect Disord Drug Targets*. 2013; 13(1): 75-84.

22. Hanna RN, Carlin LM, Hubbeling HG, Nackiewicz D, Green AM, Punt JA, Geissmann F, Hedrick CC. The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C⁺ monocytes. *Nat Immunol*. 2011; 12(8): 778-85.

23. Joseph SB, Bradley MN, Castrillo A, Bruhn KW, Mak PA, Pei L, Hogenesch J, O'Connell RM, Cheng G, Saez E, Miller JF, Tontonoz P. LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell*. 2004; 119(2): 299-309.

24. Joseph SB, McKilligin E, Pei L, Watson MA, Collins AR, Laffitte BA, Chen M, Noh G, Goodman J, Hagger GN, Tran J, Tippin TK, Wang X, Lusis AJ, Hsueh WA, Law RE, Collins JL, Willson TM, Tontonoz P. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99(11): 7604-9.

25. Kang K, Reilly SM, Karabacak V, Gangl MR, Fitzgerald K, Hatano B, Lee CH. Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPAR δ regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab*. 2008; 7: 485-95.

26. Khoo NK, Freeman BA. Electrophilic nitro-fatty acids: anti-inflammatory mediators in the vascular compartment. *Curr Opin Pharmacol*. 2010; 10(2): 179-84.

Received 24.02.15

Сведения об авторах:

Корниенко Владимир Юрьевич, канд. биол. наук, науч. сотр. «НИИ атеросклероза», e-mail: uniprain@yandex.ru
Карагодин Василий Петрович, канд. биол. наук, доцент Российского экономического университета им. Г.В. Плеханова, e-mail: vpk@mail.ru

Орехов Александр Николаевич, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

Алексеева Е.В.¹, Попова Т.С.², Сальников П.С.¹

Глутаматергическая нейромедиаторная система в регуляции моторной активности желудочно-кишечного тракта

¹ — ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» УДП РФ, 121359, Москва, ул. маршала Тимошенко, д. 15

² — НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, 129010, Москва, Большая Сухаревская площадь, д. 3

В обзоре представлены накопленные к настоящему времени факты, с большой долей вероятности, свидетельствующие об участии глутаматергической нейромедиаторной системы (ГНС) в регуляции моторной активности желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и позволяющие предположить значимую роль её дисфункции в формировании нарушений двигательной активности пищеварительного канала, в том числе и у больных в критическом состоянии (КС). Анализ основан на результатах многочисленных экспериментальных и клинических исследований о содержании глутаминовой кислоты (Глу) и других компонентов ГНС в центральной нервной системе (ЦНС) и автономной нервной системе (с акцентом на энтеральную нервную систему (ЭНС)) в норме, и изменениях функционирования ГНС при воспалении, гипоксии, в условиях стресса и при формировании КС.

Ключевые слова: глутаминовая кислота; глутаматергическая нейромедиаторная система; моторная активность желудочно-кишечного тракта; больные в критическом состоянии

Alekseeva E.V.¹, Popova T.S.², Sal'nikov P.S.¹

Glutamatergic neurotransmitter system in regulation of the gastrointestinal tract motor activity

¹ — FSBI «Central Clinical Hospital with Polyclinic» of the Presidential Administration of the Russian Federation, 15, str. Marshala Timoshenko, Moscow

² — N.V. Sklifosovsky Scientific Research Institute of Emergency Medicine, 3, Bolshaya Sukharevskaya square, 129010, Moscow, Russian Federation

The review include actual facts, demonstrating high probability of glutamatergic neurotransmitter system role in the regulation of the gastrointestinal tract motor activity. These facts suggest significant role of the glutamatergic neurotransmitter system dysfunction in forming motor activity disorders of the digestive tract, including in patients in critical condition. The analysis is based on results of multiple experimental and clinical researches of glutamic acid and other components of the glutamatergic neurotransmitter system in central nervous system and autonomic nervous system (with the accent on the enteral nervous system) in normal conditions and with functioning changes of the glutamatergic neurotransmitter system in case of inflammation, hypoxia, stress and in critical condition.

Keywords: glutamic acid; glutamatergic neurotransmitter system; gastrointestinal tract motor activity; patients in critical condition

Полученные в последние два десятилетия данные экспериментальных и клинических исследований позволяют утверждать, что Глу действует в качестве одного из основных нейромедиаторов не только в ЦНС, но и в ЭНС, а также в компонентах «кишечно-мозговой оси» — структурах автономной нервной системы и циркумвентрикулярных органов, участвующих во взаимодействии головного мозга и пищеварительного канала. Основными аргументами, свидетельствующими в пользу данного положения, служат подтверждения наличия рецепторов Глу, его

внешних и везикулярных транспортеров в ЭНС и структурах «кишечно-мозговой оси», зарегистрированные вызываемые Глу деполаризующие ответы в нейронах мышечной оболочки ЖКТ, увеличение сократимости различных отделов пищеварительного канала при активации рецепторов Глу, и блокада этого эффекта антагонистами Глу рецепторов. Однако нейромедиаторная роль Глу в регуляции моторной активности ЖКТ всё еще остается дискуссионной, поскольку отдельные экспериментальные и клинические исследования имеют противоречивые результаты, и наряду с данными, подтверждающими нейротрансмиттерную роль Глу в регуляции двигательной активности пищеварительного канала, как у животных, так и у человека, имеются и результаты, не доказавшие этой роли Глу.

Для корреспонденции: Алексеева Е.В., канд. мед. наук, врач анестезиолог-реаниматолог отделения анестезиологии и реанимации ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» УДП РФ.

Особое значение Глу, как наиболее распространенной многофункциональной аминокислоты (АК) в организме, потенциальная возможность использования её свойств с целью коррекции гастроинтестинальной дисфункции [1; 2], и данные об изменении содержания Глу в плазме крови как неблагоприятном прогностическом факторе при ряде заболеваний и у больных в критическом состоянии [3; 4] явились предпосылками для изучения состояния ГНС в самых различных экспериментальных и клинических ситуациях. Рассмотрению этих фактов и посвящен настоящий обзор, в котором приведены результаты многочисленных исследований отечественных и зарубежных авторов и данные собственных клинических наблюдений.

Взгляд современных авторов на основы нервной регуляции моторной активности ЖКТ

С позиции современных авторов, двигательная активность ЖКТ, обеспечивающая поступление воды, электролитов и питательных веществ, выделительную и иммунную функцию [5], зависит от сбалансированного функционирования её нервной и гормональной регуляции [6]. Нервная регуляция (координирующее влияние нервной системы на клетки, ткани и органы, один из основных механизмов саморегуляции) моторной активности ЖКТ включает внешнюю, экстраорганную иннервацию пищеварительного канала (представленную ЦНС и парасимпатическим и симпатическим отделом автономной нервной системы) и внутреннюю, интраорганную, осуществляемую ЭНС [6; 7; 8]. Большинство синапсов в нервной системе, как известно, являются химическими. Процесс передачи сигнала в них осуществляется посредством нейротрансмиттеров — нейромедиаторов и нейромодуляторов, веществ, соответственно, высвобождаемых нейронами, и непосредственно передающих сигнал между нейронами и от нейронов на эффекторные клетки, и модулирующих эффект нейромедиаторов [9; 10]. На сегодня основополагающим является принцип множественности химических сигналов — в одном нейроне, как правило, синтезируется несколько нейромедиаторов различной химической природы, каждое нервное окончание может высвободить более одного медиатора. «Ставшее привычным понятие «ергичности» нейрона и синапса можно принимать лишь как условное» [11]. В настоящее время рассматривается существование не только синаптической, но и диффузной системы передачи нервного импульса. Механизм синаптического пути передачи сигнала заключается в высвобождении медиатора в синаптическую щель, активации рецепторов и удалении медиатора

из синаптической щели [12]. При диффузной системе передачи нервного импульса ответ опосредован активацией рецепторов, расположенных на различных участках нейронов — соме, дендритах, аксоне и глии [13]. Химические синапсы подразделяются на возбуждающие, способствующие генерации новых импульсов, и тормозные, приводящие к снятию действия поступающих сигналов [11].

Традиционно в литературных источниках наиболее часто упоминается о регулирующем влиянии на двигательную функцию различных отделов ЖКТ холинергической (передатчик сигнала — нейромедиатор ацетилхолин (АЦХ)), адренергической (норадреналин), серотонинергической (серотонин), нитроксидергической (нитроксид (NO)), пуринергической (аденозин, АТФ), пептидергической (субстанция Р, вазоинтестинальный пептид, мотилин) нейромедиаторных систем [14]. Одними из основных преимущественно возбуждающих нейротрансмиттеров в регуляции моторной активности ЖКТ признаны — ацетилхолин (в качестве ведущего), мотилин, субстанция Р, из преимущественно тормозных — норадреналин (адреналин — как нейромодулятор), оксид азота ((NO), позиционируется, как основной) и вазоактивный интестинальный полипептид [15; 16].

Многофункциональная роль глутаминовой кислоты в организме

Глу (в литературе используется, также термин глутамат — анион Глу), является наиболее распространенной заменимой многофункциональной АК [17; 18; 19]. Как основной субстрат углеводного и азотистого обмена, Глу участвует в синтезе других АК [20; 21], ацетилхолина, АТФ, лактата, мочевины, функционировании антиоксидантной системы глутатиона, связывании аммиака, а также являясь одной из нейроактивных АК, выполняет функции нейромедиатора [22; 23].

В организм Глу поступает в составе пищи или вновь образуется из альфа-кетоглутарата, глутамина, орнитина, глюкозы и аспарагиновой кислоты [24; 25]. Относительно высокое внутриполостное содержание Глу в тонкой кишке в сравнении с более низкой её концентрацией в плазме крови, по утверждению А. Kitamura и соавт. [26], наиболее вероятно, обусловлено её ролью основного (наряду с глутамином) энергетического субстрата в кишечных эпителиоцитах [26]. Всасывание Глу происходит в тонкой кишке. Его интенсивное окисление, главный метаболический исход Глу в энтероцитах и колоноцитах, осуществляется независимо от пути поступления — интралюминального или из артериальной крови (в колоноциты Глу поступает с током крови) [21]. В поло-

сти толстой кишки Глутамат может служить предшественником бутирата и ацетата, образуемых с помощью бактерий в реакциях брожения [19; 27].

Нейромедиаторная роль глутаминовой кислоты и компоненты глутаматергической нейромедиаторной системы

Глутамат — одна из нейромедиаторной АК, представитель класса «возбуждающих аминокислот» [18], её действие рассматривают в синаптической и диффузной системе передачи нервного импульса [12]. Глутаматергический механизм регуляции синаптической передачи имеет место и в мионевральном синапсе [28]. Метаболизируется Глутамат в клетках глии [25].

Компонентами ГНС служат: рецепторы Глутамата, внешние транспортеры ЕААТ (excitatory amino acid transporter) Глутамата, в настоящее время их известно пять, они переносят Глутамат через клеточную мембрану и везикулярные транспортеры Глутамата (Glutamate vesicular transporter VGluT). Установлено их три изоформы (VGluT₁₋₃), они способствуют накоплению Глутамата в высоких концентрациях в синаптических пузырьках [29; 30]. Считается, что в малых везикулах содержится один Глутамат, в состав больших везикул Глутамат входит совместно с ко-трансмиттерами [31]. Перенос Глутамата транспортерами — Ca²⁺- и энергозависимый процесс. [25]. Функционирование ЕААТ_{1,5} основано на градиенте ионов натрия, калия и Глутамата. Экспрессия и активность ЕААТ_{1,5} может меняться под влияние различных метаболических процессов, в результате действия цитокинов и факторов роста [12].

Рецепторы Глутамата подразделяют на ионотропные и метаботропные. Ионотропные рецепторы Глутамата (iGluR), содержащие в своем составе катион-специфические ионные каналы, в соответствии с лигандами, обеспечивающими их активацию условно подразделяют на α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионатные (AMPA), каинатные и N-метил-D-аспартатные (NMDA) рецепторы. В каналах NMDA-рецепторов выделяют субъединицы NR₁ и NR₂ [32]. Метаботропные рецепторы Глутамата (mGluR), связанные с G-белками, в зависимости от аминокислотной последовательности, фармакологических свойств и механизмов трансдукции сигнала, классифицируют на три группы (mGluR I, mGluR II, mGluR III), mGluR I (mGluR₁, mGluR₅) активизируют фосфолипазу C, которая гидролизует фосфатидилинозитол на инозитолтрифосфат и диацилглицерин, mGluR II (mGluR₂, mGluR₃) и mGluR III (mGluR₄, mGluR₆, mGluR₇, mGluR₈), ингибируют активность аденилциклазы. (Примеч. — аденилциклаза катализирует синтез цАМФ, его увеличение связано с релаксацией мышечной ткани) [33; 34; 35; 36; 37].

Компоненты глутаматергической нейромедиаторной системы в ЦНС, автономной нервной системе и ненейронных структурах

В ЦНС Глутамат является основным возбуждающим медиатором [38; 39]. Глутамат и окончания глутаматергических нейронов выявлены в коре больших полушарий, стриатуме, гиппокампе, черной субстанции, в миндалине и на клетках-зернах мозжечка, обонятельной луковице, сетчатке [11; 36; 40; 41]. По разным источникам от 40-50% синапсов в ЦНС и до 70% возбуждающих нейронов в ЦНС имеют глутаматергическую нейротрансмиссию [24; 34]. Глутамат служит основным нейромедиатором задних рогов спинного мозга. Он выделяется всеми классами первичных афферентных волокон, в том числе ноцицептивными, а также аксонами многих спинальных интернейронов [40].

Компоненты ГНС (рецепторы и транспортеры Глутамата), выявлены в сердце, печени, почках, легких, щитовидных железах, яичнике, яичке и коже. Это свидетельствует о возможном участии ГНС в регуляции функционирования сердечно-сосудистой, дыхательной, эндокринной и репродуктивной систем, «оси — щитовидная железа — гипофиз» (агонисты iGluR вызывают повышение концентрации Т3 и Т4 в крови у крыс), в нейронной регуляции ноцицептивных реакций [37; 42; 43].

Глутамат, его рецепторы и транспортеры установлены в плазме и клетках крови (в частности в лимфоцитах) [36; 37], в связи с чем некоторые авторы его рассматривают его, как иммуномодулятор [42; 43].

Компоненты глутаматергической нейромедиаторной системы в ЖКТ

В ЭНС присутствует большое количество нейротрансмиттеров, и согласно данным, как экспериментальных, так и клинических исследований, включая Глутамат.

Уже в 1997 г. M.T Liu et al. в экспериментальных исследованиях была установлена иммунореактивность Глутамата, транспортера Глутамата (EAAC1) и рецепторов Глутамата (NMDA и AMPA) в обоих (межмышечном и подслизистом) сплетениях ЭНС у морских свинок. А также продемонстрировано, что Глутамат вызывает деполяризующие ответы в нейронах мышечной оболочки кишечника [41; 44]. В 2001 г. A.L. Kirchgessner описывает иммунореактивность к подгруппам рецепторов NMDA (NR1, NR2A и NR2B) в нейронах, относящихся к мышечной оболочке и подслизистых нейронах подвздошной кишки морской свинки и крысиной толстой кишки, а также присутствие всех четырех подгрупп рецепторов AMPA в ЭНС морской свинки

[45]. В 2003 г. С. Giagonia и соавт. иммунореактивность NMDA рецепторов (NR1) в нейронах и клетках кишечной глии мышечной оболочки и подслизистых ганглиях, а также в аксонах на уровне циркулярных мышц толстой кишки выявлена у человека [46]. В настоящее время mGlu₄, 6, 7 и 8 установлены вдоль всего ЖКТ человека (рис.1) [37], иммуногистохимическими методами в ЖКТ установлена экспрессия EAAT₁₋₄ (EAAT₁ в том числе у человека) [1; 47].

Впервые наличие VGluT₂ в межмышечном и подслизистом сплетении ЭНС у крыс, мышей, морских свинок и человека продемонстрировали Q.Tong и соавт. в 2001 г. [48]. Позже иммуноцитохимическими методами были выявлены все три изоформы VGluT в ЭНС тонкой кишки эмбриона человека. В настоящее время иммунореактивность VGluT в ганглиях мышечной оболочки ЖКТ у 14-недельных плодов считают морфологическим доказательством участия ГНС в регуляции кишечного транзита в неонатальном периоде, поскольку перистальтика эмбриональной тонкой кишки регистрируется с 12-й недели беременности [30].

По-видимому, Глу может выделяться в синаптическую щель из двигательных нервных окончаний наряду с АЦХ, как ко-медиатор [49]. Иммунореактивность Глу выявлена в холинергических тонкокишечных нейронах [41; 44]. Данные Q.Tong et al., (2001) свидетельствуют, что многие из нейронов содержат VGluT₂ и везикулярный транспортер АЦХ (VAChT), подтверждая более ранние предложения, о возможности одновременного наличия в окончаниях нейронов именно возбуждающих синапсов Глу и АЦХ, поскольку в мотонейронах, содержащих оксид азота (NO), VGluT (или Глу) выявлено не было [48].

Компоненты глутаматергической нейромедиаторной системы в структурах «кишечно-мозговой оси»

Имеются подтверждения, что Глу выполняет функцию нейромедиатора не только локально в головном мозге и ЖКТ, но также и в структурах «кишечно-мозговой оси». [37], или «gut-brain axis», в основе

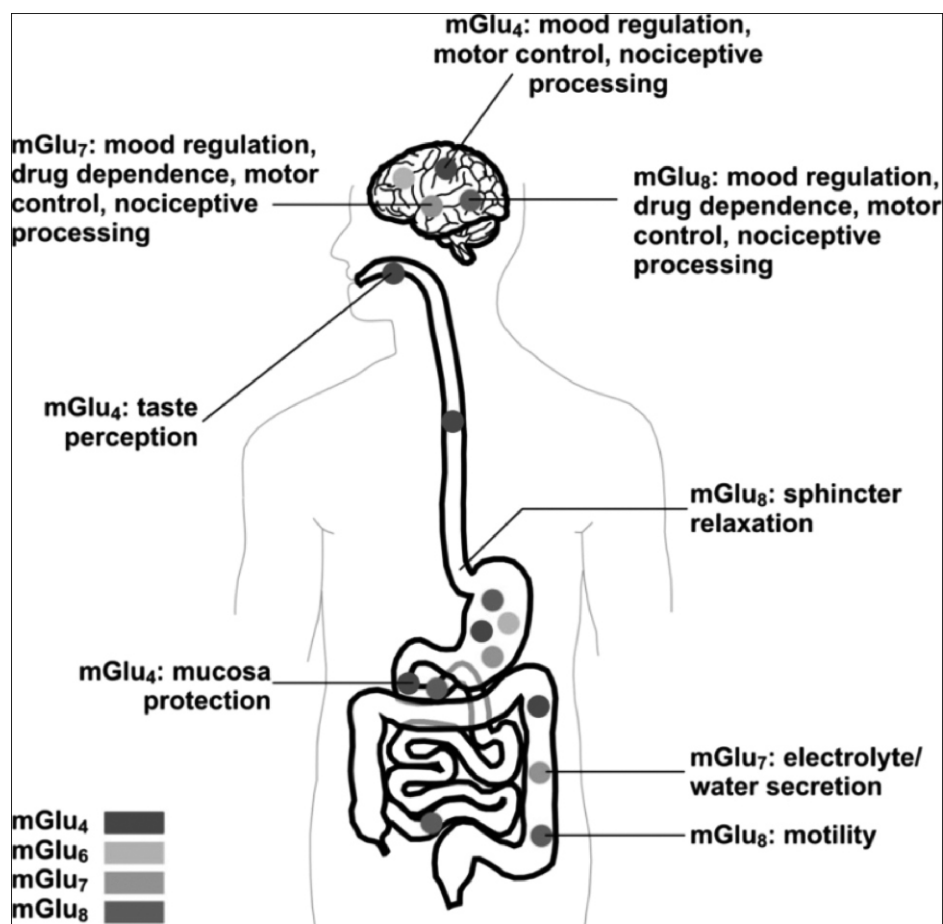


Рис. 1. Локализация и функции mGlu III в головном мозге и ЖКТ. М. Julio-Pieper et al. / European Journal of Pharmacology 698 (2013) 19-30.

функционирования которой лежат нейронные, эндокринные и иммунные механизмы, обеспечивающие двунаправленную связь между головным мозгом и пищеварительным каналом. К структурам «кишечно-мозговой оси» относят блуждающие, крестцовые, чревные нервы, ядро одиночного пути, гипоталамус, таламус и корковые отделы [50; 51].

Уже в 2000 г. E.R. Partosoedarso и L.A. Blackshaw предполагали участие Глу в передаче нервных импульсов от слизистой оболочки ЖКТ к нейронным сплетениям ЭНС и головному мозгу, посредством выпуска Глу, в результате активации хемо- и механорецепторов слизистой оболочки ЖКТ [15]. В 2001 г. была установлена иммунореактивность VGluT₂ в афферентных нейронных волокнах в составе блуждающего и спинальных нервов, в центральных отростках вагусных афферентов в ядре одиночного пути ((nucleus. tractus solitarius), которое является общим для VII, IX и X пар черепно-мозговых нервов, на его клетках заканчиваются волокна, проводящие импульсы вкусовой чувствительности) [48]. В настоящее время отростки первых афферентных нейронов блуждающего и спинальных нервов выявлены во всех трех оболочках ЖКТ (слизистой, мышечной и серозной) на протяжении от пищевода до прямой кишки [37].

Глутамат в активации моторно-эвакуаторной функции ЖКТ

Предполагают, что в регуляции моторной активности ЖКТ могут участвовать и ионотропные и метаболитные рецепторы Глу.

AL Kirchgessner (2001) показано, что в условиях эксперимента Глу стимулирует сокращение мышечных волокон, активируя рецепторы NMDA на возбуждающих холинергических нейронах (атропин блокирует вызванные Глу (или NMDA-вызванные) сокращения) [45]. Этот механизм — увеличение выделения АЦХ в ЭНС в связи с активацией Глу рецепторов NMDA — был предложен в качестве возможной Глу-индуцированной регуляции сокращений в ЖКТ и у человека [46; 52]. Описана причастность рецепторов AMPA к модуляции подвижности дистального участка толстой кишки у морской свинки [45]. По данным P.J. Hornby (2001), активация NMDA — рецепторов и He-NMDA рецепторов в dorsal medullary nucleus увеличивала сократимость желудка, и данный эффект был заблокирован антагонистами NMDA рецепторов [35].

M Julio-Pieler, 2013 описывают участие mCluR III в регуляции вкусового восприятия, работы пищеводных сфинктеров, моторной и секреторной активности желудка, тонкой и толстой кишки [37].

Наиболее известным является мнение, что преобладающую роль в активирующем влиянии нервной регуляции на гастроинтестинальную моторную активность играет холинергическая нейромедиаторная система [48; 52], по другим источникам ключевым нейромедиатором моторики ЖКТ служит серотонин [50]. Вместе с тем, установлено, что вызванные Глу сокращения гладкомышечных волокон дна желудка по мощности, составляют 38,83% от величины сокращений, инициированных АЦХ, и являются подобными и более сильными, чем вызванные серотонином и гистамином [53].

В экспериментальных условиях зарегистрированы инициируемые Глу сокращения (а в ряде исследований и их зависимость от концентрации Глу) мышечных волокон дна желудка [53], проксимальных и дистальных отделов тонкой кишки [17; 45], толстой [37], в том числе и прямой кишки [53].

Y. Toyomasu и соавт. (2010) продемонстрирован дозозависимый эффект вводимого в желудок глутамата натрия у собак не только на активацию, но и на координирование моторно-эвакуаторной функции желудка и проксимальных отделов тонкой кишки [17].

Эти данные были подтверждены M. Kusano и соавт. (2013) в клиническом наблюдении — у здоровых мужчин добровольцев внутрижелудочное введение глутамата натрия способствовало увеличению эвакуаторной способности желудка. Последнее может указывать на ещё один потенциальный способ улучшения замедленного опорожнения желудка [2], а по данным D.G. Burrin и B. Stoll (2009) и стимуляции гастродуоденальной двигательной активности с целью увеличения толерантности к энтеральному питанию, в том числе у недоношенных детей [1].

Вместе с тем, G.D. Wang и соавт. (2014) в своем исследовании не выявили ни стимуляции, ни ингибирования сократительной активности тонкой кишки морской свинки и человека, под влиянием, как L-Глу, так и агонистов рецепторов Глу [54].

Необходимо отметить, что в пищевой промышленности глутамат натрия широко используется как вкусовая добавка ко многим продуктам [55; 56]. В полости рта, Глу в составе пищевых продуктов вызывает уникальный вкус, который, как правило, способствует формированию условного рефлекса к пероральному употреблению белка. [57]. В нескольких обзорах содержится выводы об отсутствии доказательств причастности глутамата натрия к серьезным проблемам, связанным со здоровьем населения, и он является общепризнанным в качестве безопасной пищевой добавки. В исследовании у недоношенных детей пероральный прием Глу, превышающий норму его введения в 2 и 4 раза, не увеличивал его концентрацию в плазме крови. Данные о нейротоксичности в не-

скольких экспериментальных моделях получены только при энтеральном или парентеральном введении чрезвычайно высоких доз Глу [1].

Рецепторы NMDA в условиях воспаления

По данным J Kaszaki и соавт. (2012), в начальном периоде локальной воспалительной реакции экспрессия NMDA-рецепторов на нейронах, относящихся к мышечной оболочке ЖКТ, увеличивается, обуславливая повышенную возбудимость и гастроинтестинальную гиперкинезию. Низкие дозы эндотоксина изменяют миоэлектрическую активность тонкой кишки, вызывая повторные «всплески» потенциалов действия, что сопровождается увеличением транзита кишечного содержимого. Когда воспаление протекает тяжело или длительно и простирается к более глубоким слоям тканей, увеличивается выработка провоспалительных цитокинов и в частности фактора некроза опухоли-альфа (ФНО-α). Провоспалительные цитокины стимулируют выпуск NO (вызывая дисфункцию нитроксидергической нейротрансмиссии) и простагландинов, что ведет к нарушению гладкомышечной сократимости и супрессии двигательной активности ЖКТ [52].

Известно, что активация воспалительных и иммунных процессов сопровождается увеличением ферментов «кинуринового пути» — генерации агониста NMDA — хинолиновой кислоты и его антагониста — кинуреновой кислоты с широким спектром антагонистических свойств в супрафизиологических концентрациях. Кинуреновая кислота является также антагонистом α₇ никотиновых ацетилхолиновых рецепторов и подавляет дофаминергическую нейротрансмиссию [58]. Баланс этих веществ в течение воспалительной реакции может иметь глубокое влияние на возбудимость кишечных нейронов и, следовательно, на моторную активность ЖКТ [59]. Во многих случаях неинфицированного воспалительного процесса (гипоксии и ишемии-реперфузии), а также при острых или хронических инфицированных воспалительных реакциях выявлено увеличение активности ферментов кинуренинового пути метаболизма триптофана — индоламин — 2,3-диоксигеназы (в легких, плаценте, почках, селезенке, крови, головном мозге) и триптофан-2,3-диоксигеназы (в печени). Что в конечном итоге приводит к повышенному образованию кинуреновой кислоты. Выраженность активации ферментов «кинуринового пути» коррелирована с тяжестью и неблагоприятным исходом течения инфицированных воспалительных процессов, уровни метаболитов индоламин — 2,3-диоксигеназы увеличены в плазме крови и цереброспинальной жидкости (ликворе) у пациентов с сепсисом. Содержание L-кинурина в плазме крови повышено у пациентов с болезнью Крона и другими ишемическими и воспалительными заболеваниями органов брюшной полости [52].

Защитная и разрушительная роль активации NMDA-рецепторов — «NMDA-рецепторный парадокс»

Установлено, что длительная чрезмерная активация NMDA-рецепторов вызывает некроз и апоптоз нейронов [60]. Но и блокада NMDA-рецепторов в естественных условиях также вызывает гибель нейронов. Согласно ранее известной модели, метаболические реакции в нейроне на стимуляцию NMDA-рецепторов имеют колоколообразную кривую, где оба варианта «слишком много и слишком мало» — потенциально опасны [61]. Их недостаточная или, напротив, чрезмерная активность становится причиной дезорганизации синаптических процессов [38]. Значительное повышение концентрации Глу может вызвать перевозбуждения его рецепторов и привести к увеличению внутриклеточной концентрации Na⁺ и Ca²⁺, что способствует повреждению нейронов или их гибели [62].

Согласно новой модели, активация синаптических NMDA-рецепторов оказывает нейропротекторное действие, в то время как стимуляция экстрасинаптических NMDA-рецепторов преимущественно инициирует «пути клеточной гибели» [61; 63]. По заключению G.E. Hardingham and H. Bading (2010) «судьба нейронов» определяется не только общей выраженностью стимуляции NMDA-рецепторов, но и тем, в какой мере активированы синаптические и экстрасинаптические NMDA-рецепторы. Доказательства нейропротекторного эффекта активации NMDA-рецепторов предполагают потенциальную возможность его использования с целью восстановления и профилактики отсроченной гибели нейронов в постреперфузионном периоде [61].

Метаболизм и физиологические эффекты глутамата в условиях ишемии

В настоящее время сведения о метаболизме и физиологических эффектах Глу в условиях гипоксии остаются дискуссионными [64]. По данным О.И. Писаренко (1991) и HR Zielke и соавт. (2009), окисление эндогенного Глу резко увеличивается в условиях ишемии, что приводит к значительному снижению его внутриклеточного содержания [65; 66]. Увеличение потребления Глу и/или глутамина в условиях гипоксии SA Brose и соавт. (2013) описывают в качестве одного из механизмов адаптации тканей к анаэробным условиям. Как известно, основным энергетическим субстратом клеток является глюкоза, в качестве дополнительных — нейроны и клетки глии могут использовать в первую очередь Глу и аспартат [11]. Кислородное ограничение приводит к генетическому и биохимическому перепро-

раммированию центрального метаболизма — в клетках, выращенных в условиях гипоксии, основная фракция ацетила-коэнзима А образуется не из глюкозы (рис.2), а через путь карбоксилирования из глутамината. [67]. Согласно Е.В. Стельмашук (2010), при гипоксии или ишемии активность глутаминатазы (фермента, посредством которого в митохондриях осуществляется образование Глутамината из глутамината) может значительно возрасти [68]. По данным J.L. Stobart and С.М. Anderson (2013), потребление Глутамината в астроцитах (их аналогом в ЖКТ являются клетки кишечной нейроглии) коррелирует с повышением гликолиза и лактата [69].

Согласно T Welbourne и I Nissim (2001), хронический метаболический ацидоз также уменьшает внутриклеточное содержание Глутамината [70].

По другим сведениям, активность глутаминсинтетазы, локализованной в основном в клетках глии (она катализирует переход Глутамината в глутамин), резко падает при ишемии-реперфузии в мозге грызунов и у человека при многих известных нейродегенеративных заболеваниях [71]. Эксайтотоксичность, как полагают, сопутствует широкому кругу хронических нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и боковой амиотрофический склероз [62]. Согласно Kirchgessner A.L. (2001), повышенная активация рецепторов Глутамината может быть обусловлена гипоксией и ишемией [45].

Методы определения содержания глутаминовой кислоты в биологических средах

Как известно, для изучения механизмов развития функциональных нарушений органов и систем, и поиска новых лабораторных маркеров используют показатели, отражающие состояние их нейрогуморальной регуляции [72]. АК исполняют роль интермедиаторов, связывающих между собой основные метаболические пути. В норме в крови и тканях поддерживается относительное постоянство содержания аминокислот (АК). В связи с этим, исследование АК состава плазмы крови, может служить интегральным показателем функционирования регуляторных систем организма [73]. Снижение уровня медиатора в ткани, может свидетельствовать о повышенном его высвобождении или об угнетении синтеза [23].

Возвращаясь к вопросу о содержании Глутамината в организме, по данным A. Leibowitz et al. (2012), его концентрация в крови отрегулирована выпуском от печени и поглощением главным образом в скелетных мышцах. Точные механизмы, которые приводят к изменению уровня Глутамината в плазме крови остаются неизвестными, но, в итоге они могут заключаться в выпуске или перераспределении Глутамината между органами или активации естественных нейтрализующих механизмов [74].

Концентрация Глутамината во внеклеточной жидкости определяет степень стимуляции рецептора [75]. Содержание Глутамината в тканях (интерстициальной жидкости головного мозга, зоне межкисечного анастомоза), может



Рис. 2. Цикл трикарбоновых кислот и сопряженные реакции [Нейрохимия. Под ред. И.П. Ашмарина, В.П. Стукалова, 1996].

быть исследовано путем применения тканевого микродиализа [76]. Однако инвазивность методики и то обстоятельство, что микродиализ отражает изменения концентрации исследуемого вещества в очень ограниченном объеме паренхимы органа, ограничивает его широкое использование [77]. Неинвазивным способом определить концентрации нескольких нейрохимических веществ, как в поврежденной, так и в морфологически неизменной ткани мозга возможно с помощью магнитно-резонансной спектроскопии [78].

Но наиболее доступными средствами косвенной оценки глутаматного гомеостаза на сегодня признаны определения концентрации Глу в цереброспинальной жидкости и плазме крови [36]. Доминирующим методом идентификации АК служит высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), наиболее совершенным способом детектирования является масс-спектрометрический [23]. По данным клинических исследований, концентрация Глу в плазме периферической крови (в частности у больных с тяжелой черепно-мозговой травмой), отражает выраженность неврологических проявлений глутаматергической дисфункции [79].

Одновременная оценка уровня исследуемого медиатора (например, Глу), наряду с содержанием продуктов его инактивации (глутамина) отражает кругооборот соответствующего медиатора. Методологически наиболее правильными, согласно В.К. Поздеева и Н.В. Поздеева (2013), являются параллельные исследования уровней медиатора и продуктов их инактивации в структурах исследуемых тканей (например, головном мозге) и одновременно в среде (цереброспинальной жидкости, плазме крови), куда в значительной степени высвобождаются эти вещества. Однако такие исследования в подавляющем большинстве случаев возможны лишь в экспериментальных условиях [23].

Далее, будут представлены результаты экспериментальных и клинических исследований, отражающих оценку состояния ГНС в условиях стресса при сохраненных и нарушенных адаптационных возможностях организма, а также у больных в критическом состоянии.

Содержание глутаминовой кислоты в плазме крови в условиях стресса при сохраненных адаптационных возможностях организма

По данным С.В. Глинник и соавт. (2007) тепловое воздействие у здоровых крыс приводило к увеличению концентраций большинства исследованных аминокислот в плазме крови и головном мозге [73]. Уровень аутоантител к Глу в крови животных был повышенным, как во время стрессорной нагрузки, так и после стрессорных воздействий [80].

В экспериментальном исследовании К. Noworyta-Sokolowska et al. (2013), после однократного периферического введения высокой дозы липополисахарида (ЛПС), отмечалось значимое увеличение внеклеточной концентрации Глу. По заключению авторов эксперимента на ранней стадии воспалительной реакции ЛПС активизирует клетки глии и приводит к увеличению выработки нейротрансмиттеров (в частности Глу) [81].

У здоровых добровольцев при интенсивной физической нагрузке (60-минутная велоэргометрия) содержание Глу в плазме крови значительно возрастало, а его внутримышечная концентрация снижалась. Наиболее вероятными механизмами повышения концентрации Глу по заключению авторов исследования при этом могли служить повреждения скелетных мышц, или перераспределение Глу из них и других периферических тканей, являющих депо Глу [74].

По данным J. Wernerman и соавт. (1993) и F. Hammarqvist и соавт. (2001) у здоровых добровольцев после начала им инфузии адреналина или комбинации стрессорных гормонов (сочетанного введения адреналина, кортизола, глюкагона) установлено снижение Глу в мышечной ткани (без снижения Глу в плазме крови) [82; 83].

Снижение концентрации Глу в скелетных мышцах на протяжении первых 48 часов зарегистрировано у пациентов без тяжелых сопутствующих заболеваний, перенесших абдоминальное оперативное вмешательство [84].

Таким образом, в организме при возникновении стресса и сохраненных адаптационных возможностях наиболее часто наблюдается увеличение содержания Глу в плазме крови, как проявление повышения функционирования ГНС. Наиболее вероятными механизмами этого процесса служат перераспределение нейромедиатора из периферических тканей, служащих его депо и увеличение выработки Глу клетками глии при воспалении.

Содержание глутаминовой кислоты в плазме крови в условиях стресса при снижении адаптационных возможностей организма и при критических состояниях

Компонентами критического состояния любой этиологии, как известно, служат катехоламинемия, гипоксия, гиповолемия, метаболический ацидоз [85]. При снижении P_aO_2 ниже 60 мм рт ст в результате симпатической стимуляцией активируются хеморецепторы каротидного синуса и аорты [10]. Сепсис, травма и обширные оперативные вмешательства сопровождаются выбросом контринсулярных гормонов и цитокинов [86].

В условиях эксперимента, в исследованиях, проведенных у добровольцев, а также при клинических наблюдениях у больных было выявлено, что умеренная и высокая степень выраженности метаболической стрессовой реакции может сопровождаться уменьшением содержания Глу в плазме крови. Наиболее вероятными механизмами снижения Глу концентрации в плазме крови при этих процессах по заключению ряда авторов, служит угнетение его синтеза в печени и/или увеличение потребления в тканях. [3], и, по-видимому, является проявлением истощения ГНС.

Вместе с тем, снижение функционирования ГНС в условиях стресса может быть оценено и как проявление типовой защитно-приспособительной реакции, предупреждающей генерализацию патологического процесса. При действии стрессоров возможно развитие угнетения афферентно-эфферентных центральных взаимодействий с усилением «автономности» в регуляции. В остром периоде повреждения отделов гастродуоденального комплекса (в частности пилорического отдела желудка), происходит консолидация процессов торможения миоэлектрической и афферентной активности всех структур гастродуоденального комплекса [87].

В экспериментальных условиях Д. Клох и соавт. (2010) показали, что длительное течение стресса (в модели нейроэндокринных постстрессорных нарушений) приводит к снижению Глу и глутамин (основного метаболита Глу) в медиальной префронтальной коре головного мозга. И служит доказательством индуцированного длительным стрессом снижения нейронной активности без изменения структурной целостности нейронов в корковых зонах мозга [88].

По данным А. Leibowitz и соавт. (2012), введение адреналина или кортикотропин-релизинг фактора у крыс вызывает значительное уменьшение концентрации Глу в крови. [74]. Преимущественно уменьшение содержания АК в плазме крови и мозге в ответ на тепловой стресс у животных, страдающих гипотиреозом, по предположению С.В. Глинник и соавт. (2007), возможно, объясняется снижением адаптационных возможностей организма экспериментальных животных [73].

Эндотоксемия (интраперитонеальная инъекция ЛПС) в условиях экспериментов, проведенных С. Voutry et al. (2012), вызывала быстрое уменьшение концентрации почти всех аминокислот, включая Глу в плазме крови и мышечной ткани [89].

Во время модулирования прогрессирующей воспалительной реакции (введение ЛПС — в течение 5 дней) выявлено значительное снижение внеклеточной концентрации Глу, а также допамина и аденозина. По заключению авторов уменьшение внеклеточ-

ного уровня Глу, вероятно было обусловлено значительным повреждением тканей и возникновением сепсиса [81].

По данным В.М. Бондаренко и Рябиченко Е.В. (2013), хроническое течение стресса вызывает снижение не только синтеза серотонина, но и других нейромедиаторов, воздействующих на ЖКТ. Последнее не только усиливает воспаление (например, при системных хронических инфекциях), но и может привести к нарушению нейропластичности и нейрогенерации [50]. При КС по мере стихания остроты патологического процесса или в связи с длительностью его течения и масштабом поражения медиаторная буря сменяется истощением, уровень нейромедиаторов падает ниже нормы [90].

Содержание глутамата в плазме крови при туберкулезе, политравме, сепсисе

В экспериментальном исследовании у морских свинок с различной тяжестью туберкулезного процесса (выраженностью воспалительной реакции, интоксикационного синдрома и распространенности процесса) концентрацию Глу в плазме менее 76 мкмоль/л наблюдали при тяжелом состоянии животных, в интервале концентрации Глу — 125—227 мкмоль/л — при средней степени тяжести, и более 227 мкмоль/л — при легкой [91].

У пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), выявлено снижение концентрации Глу в плазме и ткани скелетных мышц [92; 93]. По мнению авторов, наблюдаемое снижение в плазме уровня АК возможно имеет связь с воспалительным процессом [92].

R.F. Vesali и соавт. (2005) при моделировании начальной фазы сепсиса у человека (после введения эндотоксина здоровым добровольцам) описывают непрерывное уменьшение с первых часов эндотоксемии концентрации Глу в артериальной крови [94].

Было показано, что у пациентов с политравмой и/или сепсисом [95; 96], септическим шоком [3] концентрация Глу в плазме снижается по сравнению с показателями нормы. А также, что относительно более низкие значения концентрации Глу в плазме могут служить независимым предиктором неблагоприятного исхода в ОРИТ у пациентов с сепсисом [4] и септическим шоком [3].

Эти данные приобретают особую актуальность в сопоставлении с определением сепсиса на основе концепции системной воспалительной реакции, принятой в 1991 г. — по данным В.В. Мороза и А.М. Голубева (2013) — на основании этой концепции 90% больных отделений реанимации отвечает критериям сепсиса [97].

Содержание глутамата в плазме крови при остром нарушении мозгового кровообращения

Внезапное снижение кровотока приводит к уменьшению доставки кислорода и глюкозы в зону ишемии головного мозга. Вследствие аноксической деполаризации развивается быстрая потеря мембранного потенциала с последующей дисрегуляцией ионных потоков и нарушением функции ионотропных рецепторов Глу и АТФ [38]. В связи с энергетическим истощением, нарушением работы транспортеров возбуждающих аминокислот (как одного из главных механизмов), осуществляющих перенос Глу в астроциты, происходит накопление избыточного количества нейромедиатора в синапсе [75; 98].

В экспериментальной модели инфаркта, захватывающего часть коры и стриатума (при окклюзии средней мозговой артерии у крыс) повышение концентрации Глу в межклеточном веществе головного мозга является временным и длится всего несколько часов после возникновения ишемии. В модели «проходящей ишемии» — она нормализуется через 60 минут, в модели постоянной ишемии — через 3—6 ч. Концентрация Глу в плазме оставалась стабильной в течение первых 4 ч после начала ишемии. Затем она постепенно достигала пиковых уровней через 8—24 ч, (относительное её увеличение составляло 286—299%) и возвращалась к исходным значениям через 48—72 ч. Эти данные согласуются с наблюдаемым в течение 48—72 часов увеличением концентрации Глу в плазме крови у пациентов с ОНМК и инфарктом головного мозга, как последствием ЧМТ [36; 74].

В клинических условиях N. Puig и соавт. (2000) описывают стабильное повышение концентрации Глу в спинномозговой жидкости на протяжении до 4 сут у больных с выраженными посттравматическими ишемическими изменениями головного мозга и в течение нескольких дней после нетравматического обширного инфаркта мозга. Повышение уровня Глу в крови лишь после нескольких часов (в среднем через 4—6 ч) от начала возникновения ишемии головного мозга, авторы связывают с задержкой при прохождении Глу через гематоэнцефалический барьер [99].

В экспериментальных условиях была оценена двигательная активность ЖКТ при ишемическом повреждении головного мозга. Через 2 часа после окклюзии средней мозговой артерии зарегистрировано отчетливое снижение двигательной активности ЖКТ (главным образом вызванное активацией симпатического отдела нервной системы, кроме того, как известно, дефицит ацетилхолина сопутствует любому критическому состоянию мозга [100]). Мощный тормозной эффект на моторную функцию пищеварительного канала был неизменным в течение 12 ч [101]. Вместе

с тем, авторы этого исследования отмечают, снижение сократительная активность продольного мышечного слоя кишечной стенки при введении антагониста NMDA-рецепторов Глу. Снижение кишечного транзита при этом составляло $28,8 \pm 9,5\%$. Таким образом, было продемонстрировано, что в регуляции желудочно-кишечной двигательной активности при ишемическом повреждении головного мозга, участвуют также и элементы глутаматергической системы (NMDA-рецепторы глутамата) [101].

Содержание глутамата в плазме крови при черепно-мозговой травме

По данным Гомазкова О.А. (2014), при черепно-мозговой травме — механическом повреждении структур мозга и всплеске «активности факторов гормонального стресса», выраженность нейрохимических нарушений определяется степенью механического разрушения структур мозга, исходной устойчивостью нейрохимических систем к патологическому воздействию, быстротой и степенью включения защитных нейрохимических и функциональных систем [38].

Исследования, проведенные S.R. Petersen и соавт. (1996), продемонстрировали снижение концентрации Глу при ЧМТ в тканях головного мозга крыс и у пациентов с ЧМТ без травматических повреждений других частей тела [102].

В экспериментальных моделях черепно-мозговой травмы ЧМТ и клинических исследованиях у больных с травмой головного мозга, проведенных Dai SS и соавт. (2013), уровень глутамата в плазме был повышенным на 6, 12 и 24 ч после травмы и значительно выше при более тяжелом повреждении [103].

В клиническом исследовании Александровой Е.В. (2013) показано, что при тяжелой ЧМТ могут наблюдаться синдромы глутаматергической избыточности (прогностически более был благоприятный) и глутаматергической недостаточности. По заключению автора в настоящее время пересматривается роль повышенного Глу как отрицательного фактора при ЧМТ, на первый план выводится его влияние на процессы нейропротекции и нейрорегенерации, несмотря на повышение концентрации глутамата в остром периоде травмы, активность его NMDA-рецепторов в первые часы оказывается сниженной, что, по-видимому, препятствует развитию механизмов эксайтотоксичности [79].

Содержание глутамата в плазме крови у пациентов, находящихся на программном гемодиализе и онкологических больных

У пациентов, находящихся на программном гемодиализе при исследовании натошак в день пропуска сеанса гемодиализа было выявлено увеличение по

сравнению с референтными значениями содержания Глу в эритроцитах и плазме крови. Точная причина данного явления остается не выясненной. Вместе с тем известно, что при хронической почечной недостаточности из-за избытка белков, связывающих инсулиноподобные факторы роста (IGFBPs) происходит ингибирование биологической активности инсулиноподобных факторов роста [104; 105]. По предположению авторов исследования, возможно, что именно эта причина способствовала у больных с уремией снижению поглощения Глу в мышечной ткани, приводящей к кумуляции Глу в эритроцитах крови [106].

О повышении Глу в плазме венозной крови сообщено в результатах исследования, проведенного у 60 онкологических пациентов (35 с желудочно-кишечным раком, 19 с почечно-клеточным раком, и 6 с бронхиальным раком). По мнению авторов, увеличение концентрации Глу в плазме венозной (и в несколько меньшей степени артериальной) крови у этих пациентов было следствием сниженной возможности переноса Глу в периферические ткани. Основной гипотезой служило нарушение функционирования Na^+ -зависимой мембранной транспортной системы переноса Глу в мышечные клетки в результате патологически повышенной внутриклеточной концентрация ионов Na^+ [107].

Содержание глутамата в плазме крови у больных в терминальном состоянии (результаты собственных наблюдений)

По данным наших наблюдений (пилотного исследования) у 27 больных, находящихся в крайне тяжелом состоянии, с оценкой общей тяжести по АРАСНЕ II 30 (24; 38), 15 «хирургического профиля» (после оперативного вмешательства абдоминального и не абдоминального характера), 12 — «терапевтического профиля» (без хирургического вмешательства), из которых 7 пациентов были с ОНМК на 3—10 сутки от начала заболевания, при поступлении в отделение реаниматологии выявлены либо нормальный, либо сниженный уровень Глу в плазме крови. Повышения концентрации Глу относительно референтных значений не зарегистрировано ни в одном случае. Установлена высокая корреляционная/ассоциативная взаимосвязь ($r = 0,864$) между снижением Глу в плазме относительно нормы и цитрулина (метаболита Глу) относительно 10 мкмоль/л, (величины, оказывающей отрицательное влияние на выживаемость у пациентов в КС [108]). Выявлена умеренная корреляция ($r = 0,548$) — между снижением содержания глутамата и Глу в плазме крови относительно нормы. Снижение уровня Глу в плазме относительно референтных значений у обследованных больных бы-

ло ассоциировано с более выраженным нарушением (снижением) электрической (основополагающей моторной) активности проксимальных отделов тонкой кишки — одним из ведущих патогенетических факторов развития острой желудочно-кишечной недостаточности у больных в КС [109] и меньшей кумулятивной выживаемостью в отделении реаниматологии во временном промежутке с 3-го по 28-е сутки ($p < 0,05$).

Заключение

Большой объем накопленного фактического материала свидетельствует о роли Глу, как возбуждающего нейротрансмиттера или ко-нейротрансмиттера не только в ЦНС, но и в ЭНС, а также по ходу «кишечно-мозговой оси», что обосновывает его участие в нервной регуляции моторной активности ЖКТ и в нарушениях двигательной активности пищеварительного канала при различных заболеваниях. Дисфункция ГНС, по всей видимости, является одним из составляющих патогенетических компонентов нейрогенных нарушений моторной активности ЖКТ и у реанимационных больных. Известно, что, у больных в КС, несмотря на многогранность этиопатогенетических факторов возникновения нарушений моторной активности ЖКТ, прослеживается определенная универсальность в механизмах их развития. Одним из проявлений этой универсальности служат две последовательные фазы (нейрогенная и воспалительная) развития нарушений в многоуровневой системе нейрогуморальной регуляции двигательной активности ЖКТ при формировании КС у пациентов с первоначально различной основной патологией [110; 111].

С этих позиций можно говорить, что при стрессовом состоянии с нарушением адаптационных возможностей и при терминальном состоянии организма действует целый ряд патогенетических механизмов, определяющих в конечном итоге развитие, как правило, гипофункции ГНС, которая является наиболее неблагоприятным её состоянием с точки зрения прогностического фактора у наиболее тяжелых больных.

Список литературы

1. Burrin D.G., Stoll B. Physiologic and metabolic functions of glutamate within the stomach. *Am J Clin Nutr*. 2009;90:850S-856S.
2. Kusano M, Hosaka H, Kawada A, Kuribayashi S, Shimoyama Y, Zai H, Kawamura O, Mori M. Gastrointestinal Motility and Functional Gastrointestinal Diseases. *Curr Pharm Des*. 2013 Jul 26.
3. Poeze M, Luiking YC, Breedveld P, Manders S, Deutz NE. Decreased plasma glutamate in early phases of septic shock with acute liver dysfunction is an independent predictor of survival. *Clin Nutr*. 2008; 27(4):523-30.

4. Hirose T, Shimizu K, Ogura H, Tasaki O, Hamasaki T, Yamano S, Ohnishi M, Kuwagata Y, Shimazu T. Altered balance of the aminogram in patients with sepsis — The relation to mortality. *Clin Nutr*. 2014. — 33 (1): 179-82.
5. Гайтон, А.К. *Медицинская физиология* / А.К. Гайтон, Дж. Э. Холл / Пер. с англ. Под ред. В.И. Кобрин. М. Логосфера, 2008.
6. Ивашкин В.Т., Трухманов А.С., Маев И.В. Физиологические основы моторно-эвакуаторной функции пищеварительного тракта. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*, 2007; 5: 4-10.
7. Беляева И.А., Язык Г.В., Одинаева Н.Д. *Новые подходы к коррекции дисфункций желудочно-кишечного тракта у новорожденных*. Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. ООО «Гастро». — Санкт-Петербург. 2008; 4: 14-8.
8. Costes LM, Voetsxstaens GE, de Jonge WJ, Cailotto C. Neural networks in intestinal immunoregulation. *Organogenesis*. 2013; 9(3): 216-23.
9. Кулинский, В. И. Нейротрансмиттеры и головной мозг. *Соросовский образовательный журнал*. 2001; 6: 11-6.
10. *Базовый курс анестезиолога: учебное пособие* / под ред. Э.В.Недашковского, В.В. Кузькова. Архангельск, Северный государственный медицинский университет, 2010.
11. *Нейрохимия*. Под ред. И.П. Ашмарина, В.П. Стукалова. М.: изд. Института биомедицинской химии РАН, 1996.
12. Семьянов А.В., Казанцев В.Б. *Нейрон-глиальное взаимодействие в мозге*. Нижний Новгород; 2007.
13. Семьянов А. В. Особенности гамкергической передачи и ее модуляция гетерорецепторами в поле СА1 гиппокампа / Автореф...дисс. докт. биол. наук. 2002; Пушкино-Лондон, 33 с.
14. Лычкова А.Э. Серотонинергическая регуляция пищеварительной системы. М.: Издательство РАН, 2012.
15. Partosoedarso ER, Blackshaw LA. Roles of central glutamate, acetylcholine and CGRP receptors in gastrointestinal afferent inputs to vagal preganglionic neurons. *Auton Neurosci*. 2000; 1;83(1-2):37-48.
16. Bloom S, Ghatei M, Bech P. Measurement of gut hormones in plasma. *Methods Mol Biol*. 2013;1065:147-70.
17. Toyomasu Y, Erito Mochiki, Mitsuhiro Yanai, Yuichi Ogata, Yuichi Tabe, Hiroyuki Ando, Tetsuro Ohno, Ryuusuke Aihara, Hiroaki Zai and Hiroyuki Kuwano Intra-gastric monosodium l-glutamate stimulates motility of upper gut via vagus nerve in conscious dogs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 298:R1125-R1135, 2010.
18. *Глутаминовая кислота*. J. Russell, R. Cohn. — «VSD». 2012.
19. Nakamura E, Uneyama H, Torii K. Gastrointestinal nutrient chemosensing and the gut-brain axis: significance of glutamate signaling for normal digestion. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28 Suppl 4:2-8. doi: 10.1111/jgh.12408
20. Nissim I Newer aspects of glutamine/glutamate metabolism: the role of acute pH changes. *American Journal of Physiology — Renal Physiology* -1999 Vol. 277.F493-F497
21. Ruth M.R, Field C.J. The immune modifying effects of amino acids on gut-associated lymphoid tissue. *J Anim Sci Biotechnol*. 2013; 4(1): 27.
22. *Скальный А.В. Нутрициология: основные понятия и термины: терминологический словарь* / А.В.Скальный, И.А.Рудаков, С.В. Нотова, Т.И. Бурцева, В.В. Скальный, О.В. Баранова, С.Г. Губайдулина. — Оренбург: ГОУ ОГУ, 2005.
23. *Методы нейрохимических исследований в клинике* / В.К. Поздеев, Н.В. Поздеев. СПб: Реноме, 2013.
24. *Карабань И.Н., Карабань Н.В., Карасевич Н.В. Блокаторы глутаматных рецепторов (Неомидантан) в патогенетической терапии болезни Паркинсона и других неврологических заболеваний* (Методические рекомендации). Киев. 2009.
25. Терешина Е.В. Обзор по теме «Обоснование метаболической составляющей перфузионной среды для изолированного мозга». Москва, 2012.
26. Kitamura A, Tsurugizawa T, Uematsu A, Torii K, Uneyama H. New therapeutic strategy for amino acid medicine: effects of dietary glutamate on gut and brain function. *J Pharmacol Sci*. 2012;118(2):138-44.
27. Blachier F, Boutry C, Bos C, Tome D. Metabolism and functions of L-glutamate in the epithelial cells of the small and large intestines. *Am J Clin Nutr*. 2009 Sep;90(3):814S-821S.
28. Уразаев А.Х., Никольский Е.Е., Маломуж А.И. Глутаматергическая модуляция нервно-мышечной передачи у позвоночных. *Российский физиологический журнал*, 2004; 8:957-67.
29. Delgado TC. Glutamate and GABA in Appetite Regulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013; 15:4:103.
30. Linke N, Bodi N, Resch BE, Fekete E, Bagyanszki M. Developmental pattern of three vesicular glutamate transporters in the myenteric plexus of the human fetal small intestine. *Histol Histopathol*. 2008 Aug;23(8):979-86.
31. Журавлева З.Н., Журавлев Г.И., Ермаков А.А. Ультраструктурные особенности синаптических связей между нейронами трансплантата и мозгом реципиента. Современные проблемы науки и образования Изд. Дом «Академия естествознания» №1 2010 с.7-11
32. Матвеева Н.Ю. Нейрохимическая специализация нейронов сетчатки. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2012; 2:66-70.
33. Болдырев А.А. Нейрональные рецепторы в клетках иммунной системы. *Природа — РАН*. 2005; 7: 3-8.
34. Литвиненко И.В., Одинак М.И. Патогенетические основы формирования когнитивных и психотических нарушений при болезни Паркинсона. *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2004; 4:72-6.
35. Hornby PJ. Receptors and transmission in the brain-gut axis. II. Excitatory amino acid receptors in the brain-gut axis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001;280(6):G1055-60.
36. Tremolizzo L., Sala G., Zoia C.P., Ferrarese C. Assessing Glutamatergic Function and Dysfunction in Peripheral Tissues. *Current Medicinal Chemistry*, 2012, 19, 1310-5.
37. Julio-Pieper M, O'Connor RM, Dinan TG, Cryan JF. Regulation of the brain-gut axis by group III metabotropic glutamate receptors. *Eur J Pharmacol*. 2013 Jan 5;698(1-3):19-30.
38. Гомазков О.А. Нейрогенез как адаптивная функция мозга. М.; 2014. НИИ биомедицинской химии.
39. Vandenberg RJ, Ryan RM. Mechanisms of glutamate transport. *Physiol Rev*. 2013;93(4):1621-57.
40. Руткевич С.А., Каравай Т.В., Чумак А.Г. Роль нейроактивных аминокислот в межклеточном взаимодействии нейронов заднего рога спинного мозга. Труды БГУ 2008, Беларусь, том 3, часть 1 — 14 с.
41. Jankovic SM, Milovanovic D, Matovic M, Iric-Cupic V. The effects of excitatory amino acids on isolated gut segments of the rat. *Pharmacol Res*. 1999 Feb;39(2):143-8.

42. Абрамов Ю.Б. Иммуные аспекты центральных механизмов боли. *Бол.* 2009; 4: 2-8
43. Давыдова О.Н., Болдырев А.А. Глутаматные рецепторы в клетках нервной и иммунной систем. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии.* 2007; № 4 — ЗАО «РКИ Соверо пресс». С.28-34.
44. Liu M.T., Rothstein J.D., Gershon M.D., Kirchgessner A.L. Glutamatergic Enteric Neurons. *J Neurosci.* 1997; 17: 4764-84.
45. Kirchgessner AL. Glutamate in the enteric nervous system. *Curr Opin Pharmacol.* 2001;1(6):591-6.
46. Giaronia C, Zanettia E., Chiaravallib A M, Albarelloc L, Dominionio L, Capellac C, Lecchinia S, Frigo G Evidence for a glutamatergic modulation of the cholinergic function in the human enteric nervous system via NMDA receptors. *European Journal of Pharmacology.* 476 (2003) 63- 9.
47. Iwanaga T., Got M., Atanabe M. W. Cellular distribution of glutamate transporters in the gastrointestinal tract of mice. An immunohistochemical and in situ hybridization approach. *Biomedical Research.* 2005 -26 (6) 271-8.
48. Tong Q, Ma J, Kirchgessner AL. Vesicular glutamate transporter 2 in the brain-gut axis. *Neuroreport.* 2001, Dec 21;12 (18):3929-34.
49. Маломуж А.И., Глутаматные рецепторы в нервно-мышечном синапсе позвоночных — 2009 «Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии» сборник научных трудов под редакцией проф., д.м.н. Ильинских Н.Н. Томск; 2004, выпуск 1.
50. Бондаренко В.М., Рябиченко Е.В. Патогенетические механизмы и принципы терапии заболеваний, связанных с нарушением взаимосвязей кишечно-мозговой оси. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал)*, 2013, №4. On-line версия журнала на сайте <http://www.elmag.uran.ru>
51. Рябиченко Е.В. Кишечно-мозговые взаимоотношения в норме и патологии / Е.В. Рябиченко, В.М. Бондаренко *Верхневолжский медицинский журнал.* -2013; Т. 11, вып. 1: 34-9.
52. Kaszaki J, Erces D, Varga G, Szabo A, Vecsei L, Boros M. Kynurenic acid and intestinal neurotransmission: the role of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Neural Transm.* 2012 Feb;119(2):211-23.
53. Milovanovic D.R., Jankovic S.M. A pharmacological analysis of the contractile effects of glutamate on rat and human isolated gut smooth muscle strips. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2002;24(10):661-8.
54. Wang GD, Wang XY, Xia Y, Wood JD. Dietary glutamate: interactions with the enteric nervous system. *J Neurogastroenterol Motil.* 2014;20(1):41-53.
55. Биотехнология / Т. Г. Волова. Новосибирск; Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999.
56. Фалалеева Т.М., Самонина Г.Е., Береговая Т.В., Дзюбенко Н.В., Андреева Л.А. Влияние глипролинов на структурно-функциональное состояние слизистой оболочки желудка и массу тела крыс в условиях длительного введения глутамата натрия. *Физика живого*, 2010;18(1): 154-9.
57. Torii K., Uneyama H, Nakamura E. Physiological roles of dietary glutamate signaling via gut-brain axis due to efficient digestion and absorption. *J Gastroenterol.* 2013; 48(4): 442-51.
58. Шилов Ю.Е, Безруков М.В. Кинуренины в патогенезе эндогенных психических заболеваний. *Вестник РАМН.* 2013; 1:35-41.
59. Kaszaki J, Palasthy Z, Erczes D, Racz A, Torday C, Varga G, Vecsei L, Boros M. Kynurenic acid inhibits intestinal hypermotility and xanthine oxidase activity during experimental colon obstruction in dogs. *Neurogastroenterol Motil.* 2008;20(1):53-62.
60. Lourhmati A., Buniatian G. H., Paul C., Verleysdonk S., Buecheler R., Buadze M., Proksch B., Schwab M., Gleiter C. H., Danielyan L. Age-Dependent Astroglial Vulnerability to Hypoxia and Glutamate: The Role for Erythropoietin. *PLoS One.* 2013; 8(10): e77182.
61. Hardingham G.E., Bading H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci.* Oct 2010; 11(10): 682-696
62. Lin C.L., Kong Q., Cuny G.D, Glicksman M.A. Glutamate transporter EAAT2: a new target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Future Med Chem.* 2012; 4(13): 1689-1700.
63. Kaufman A.M., Milnerwood A.J., Sepers M.D., Coquinco A., She K., Wang L., Lee H., Craig A.M., Snyder M., Raymond L.A. Opposing Roles of Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptor Signaling in Cocultured Striatal and Cortical Neurons. *J. of Neuroscience,* 2012, 32(12): 3992-4003.
64. Metallo CM, Gameiro PA, Bell EL, Mattaini KR, Yang J, Hiller K, Jewell CM, Johnson ZR, Irvine DJ, Guarente L, Kelleher JK, Vander Heiden MG, Iliopoulos O, Stephanopoulos G. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature.* 2011 Nov 20;481(7381):380-4.
65. Писаренко О.И. Участие аминокислот в регуляции энергетического обмена мышцы сердца при ишемии и гипоксии / дисс... докт. биол наук — Москва — 1991. — 391 с.
66. Zielke HR, Zielke CL, Baab PJ. Direct measurement of oxidative metabolism in the living brain by microdialysis: a review. *J Neurochem.* 2009 May;109 Suppl 1:24-9. doi: 10.1111/
67. Fan J, Kamphorst JJ, Rabinowitz JD, Shlomi T. Fatty acid labeling from glutamine in hypoxia can be explained by isotope exchange without net reductive isocitrate dehydrogenase (IDH) flux. *J Biol Chem.* 2013 Oct 25;288(43):31363-9.
68. Стельмашук Е.В., Новикова С.В., Исаев Н.К. Влияние глутамин на гибель культивированных зернистых нейронов, индуцированную глюкозной депривацией и химической гипоксией. *Биохимия*, 2010, том 75, вып.8, с 1150-6.
69. Stobart JL, Anderson CM. Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply. *Front Cell Neurosci.* 2013; Apr 10;7:38.
70. Welbourne T, Nissim I. Regulation of mitochondrial glutamine/glutamate metabolism by glutamate transport: studies with (15)N. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 May;280(5):C1151-9.
71. Косенко Е.А. Энергетический обмен в норме и при патологии. Роль возбуждающих нейромедиаторов. М.: ЛЕНАНД, 2014.
72. Родионова О.Н., Трубина Н.В., Реутова Э.Ю., Видикер Р.В., Бабаева А.Р. Нейрогуморальный и цитокиновый дисбаланс у больных функциональными заболеваниями желудочно-кишечного тракта. *Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН.* 2008; 4: 44-6.
73. Глинник С.В, Ринейская О.Н., Романовский И.В, Красненкова Т.П. Содержание свободных

аминокислот в мозге и плазме крови крыс с экспериментальным гипотиреозом при тепловом стрессе. *Медицинский журнал*. 2007; 3:47-9.

74. Leibowitz A., Klin Y., Gruenbaum B.F., Gruenbaum S.E., Kuts R., M. Dubilet, S. Ohayon, Boyko M., Sheiner E., Shapira Y., Zlotnik A. Effects of strong physical exercise on blood glutamate and its metabolite 2-ketoglutarate levels in healthy volunteers. *Acta Neurobiol Exp*. 2012, 72: 385-96.

75. Zhou Y., Danbolt N.C. GABA and Glutamate Transporters in Brain. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013; 4: 165.

76. Ромашенко П.Н. Майстренко Н.А. Силин Н.А. Хрыков Г.Н. Струков Е.Ю. Ярошенко А.М. Внутривисцеральной микродиализ — методика ранней диагностики послеоперационной висцеральной ишемии. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2012; 3:39-44.

77. Тимофеев И.С. Тканевой микродиализ: принципы и клиническое применение метода в интенсивной терапии. *Журнал "Интенсивная терапия"*. Журнал N1. 2007 — <http://icj.ru/journal/number1> — 2007.

78. Труфанов А.Г. Магнитно-резонансная спектроскопия в диагностике метаболических изменений головного мозга при ишемическом инсульте/ автореф. дисс... канд. мед. наук. Санкт-Петербург; 2009.

79. Александрова Е.В. Синдромы дисфункции нейромедиаторных систем в процессе восстановления сознания после тяжелой черепно-мозговой травмы. Автореф. дисс... к.м.н. 2013/ — Москва, 27 с.

80. Умрюхин А.Е. Антитела к нейромедиаторам в механизмах стрессорных поведенческих реакций Автореф. Дисс док биол. наук. Москва, 2013; 47 с.

81. Noworyta-Sokolowska K, Gorska A, Golembiowska K. LPS-induced oxidative stress and inflammatory reaction in the rat striatum. *Pharmacol Rep*. 2013; 65(4):863-9.

82. Wernerman J., Hammarqvist F., Botta D., Vinars E. Stress hormones alter the pattern of free amino acids in human skeletal muscle. *Clinical Physiology*. 1993; 13:309-19.

83. Hammarqvist F., Ejesson B., Wernerman J. Stress hormones initiate prolonged changes in the muscle amino acid pattern. *Clinical Physiology*. 2001; 21 (1): 44-50.

84. Luo JL, Hammarqvist F, Andersson K, Wernerman J. Skeletal muscle glutathione after surgical trauma. *Ann Surg*. 1996;223(4):420-7.

85. Зильбер А.П. Клиническая физиология в анестезиологии и реаниматологии. М.; 1984, Медицина.

86. Основы интенсивной терапии. Руководство Всемирной ассоциации анестезиологов (WFSA)/ под ред. Б. Маккормик, Э.В.Недашковского, В.В. Кузькова. 2014; Архангельск.

87. Привалова И.Л. Интраорганные механизмы регуляции миоэлектрической активности и афферентных реакций желудка и двенадцатиперстной кишки. Автореф. дисс. докт. биол. Наук. 2006.

88. Knox D, Perrine SA, George SA, Galloway MP, Liberson I. Single prolonged stress decreases glutamate, glutamine, and creatine concentrations in the rat medial prefrontal cortex. *Neurosci Lett*. 2010;480(1):16-20.

89. Boutry C, Matsumoto H, Bos C, Moinard C, Synober L, Yin Y, Tome D, Blachier F. Decreased glutamate, glutamine and citrulline concentrations in plasma and muscle in endotoxemia cannot be reversed by glutamate or glutamine supplementation: a primary intestinal defect? *Amino Acids*. 2012;43(4):1485-98.

90. Нейрореаниматология. Выход из комы (терапия посткоматозных состояний) / Зайцев О.С., Царенко С.В. М.; Литасс, 2012.

91. Сабадаш Е. В., Скорняков С.Н. Способ оценки тяжести туберкулезной инфекции патент РФ № 2305286 ГУ "УНИИФ РОСЗДРАВА. 2005.

92. Pouw EM, Schols AM, Deutz NE, Wouters EF. Plasma and muscle amino acid levels in relation to resting energy expenditure and inflammation in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158(3):797-801.

93. Rutten EP, Engelen MP, Wouters EF, Schols AM, Deutz NE. Metabolic effects of glutamine and glutamate ingestion in healthy subjects and in persons with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(1):115-23.

94. Vesali RF, Klaude M, Rooyackers O, Wernerman J. Amino acid metabolism in leg muscle after an endotoxin injection in healthy volunteers. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;288(2):E360-4.

95. Clowes GH Jr, Randall HT, Cha CJ. Amino acid and energy metabolism in septic and traumatized patients. *JPEN J Parenteral Nutr*. 1980;4(2):195-205.

96. Martinez MJ, Giraldez J. Plasma aminogram in critical patients. *Nutr Hosp*. 1993;8(2):79-93.

97. Мороз В.В., Голубев А.М. Сепсис: принципы диагностики. *Общая реаниматология*. 2013;9(6): 5-10.

98. Hansel G., Ramos D.B., Delgado C.A., Souza D.G., Almeida R. F., Portela L.V., Quincozes-Santos A., Souza D.O. The Potential Therapeutic Effect of Guanosine after Cortical Focal Ischemia in Rats. *PLoS One*. 2014; 28; 9(2): e90693.

99. Puig N, Davalos A, Adan J, Piulats J, Martinez JM, Castillo J. Serum amino acid levels after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Cerebrovasc Dis*. 2000;10(6):449-54.

100. Холинергическая терапия при критических состояниях центральной нервной системы. По материалам VI национального конгресса анестезиологов (18-21 сентября, г. Львов). *Здоровье Украины*. 2013; 12: 18-9.

101. Ameer NH, Lee JH, Choi MA, Jin GS, Kim MS, Park BR. The Effects of Glutamate NMDA Receptor Antagonist MK-801 on Gastrointestinal Motility after Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2010;14(3):151-6.

102. Petersen SR, Jeevanandam M, Holaday NJ, Lubhan CL. Arterial-jugular vein free amino acid levels in patients with head injuries: important role of glutamine in cerebral nitrogen metabolism. *J Trauma*. 1996;41(4):687-94; discussion 694-5.

103. Dai SS, Wang H, Yang N, An JH, Li W, Ning YL, Zhu PF, Chen JF, Zhou YG. Plasma glutamate-modulated interaction of A2AR and mGluR5 on BMDCs aggravates traumatic brain injury-induced acute lung injury. *J Exp Med*. 2013 Apr 8;210(4):839-51.

104. Кварацхелия М.В., Нагаева Е.В., Зверев Д.В., Багирова Н.И., Петеркова В.А. Опыт лечения рекомбинантным человеческим гормоном роста низкорослых детей с хронической почечной недостаточностью. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2008; 5:65-72.

105. Лекции по педиатрии. Том 6. Нефрология. Под редакцией В.Ф. Демина, С.О. Ключникова, Ф.И. Руснака и И.М. Османова. РГМУ, Москва, 2006.

106. Divino Filho JC, Hazel SJ, Furst P, Bergstrom J, Hall K. Glutamate concentration in plasma, erythrocyte and muscle in relation to plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-1 and insulin in patients on haemodialysis. *J Endocrinol.* 1998;156(3):519-27.

107. Hack V., Stutz O., Kinscherf R., Schykowski M., Kellerer M. Holm E., Droge W. Elevated venous glutamate levels in (pre)catabolic conditions result at least partly from a decreased glutamate transport activity. *J Mol Med.* 1996; 74:337-43.

108. Piton G, Manzon C, Monnet E, Cypriani B, Barbot O, Navellou JC, Carbonnel F, Capellier G. Plasma citrulline kinetics and prognostic value in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2010;36(4):702-6.

109. Алексеева Е.В., Попова Т.С., Сальников П.С., Баранов Г.А., Пасечник И.Н. Анализ изменений электрической активности желудочно-кишечного тракта у больных в критических состояниях. *Общая реаниматология.* 2013; IX, 5 с. 45-55.

110. Caddell KA, Martindale R, McClave SA, Miller K. Can the intestinal dysmotility of critical illness be differentiated from postoperative ileus? *Curr Gastroenterol Rep.* 2011;13(4):358-67.

111. Алексеева Е.В., Попова Т.С., Пасечник И.Н. Функциональные нарушения моторной активности желудочно-кишечного тракта у больных в критических состояниях *Хирургия, журнал им. Н.И. Пирогова.* 2013; 9: 73-8.

Поступила

References

1. Burrin D.G., Stoll B. Physiologic and metabolic functions of glutamate within the stomach. *Am J Clin Nutr.* 2009; 90 (3):850-6.

2. Kusano M., Hosaka H., Kawada A., Kuribayashi S., Shimoyama Y., Zai H. et al. Gastrointestinal Motility and Functional Gastrointestinal Diseases. *Curr Pharm Des.* 2014; 20(16): 2775-82.

3. Poeze M, Luiking YC, Breedveld P, Manders S, Deutz NE. Decreased plasma glutamate in early phases of septic shock with acute liver dysfunction is an independent predictor of survival. *Clin Nutr.* 2008; 27(4):523-30.

4. Hirose T, Shimizu K, Ogura H, Tasaki O, Hamasaki T, Yamano S. et al. Altered balance of the aminogram in patients with sepsis — The relation to mortality. *Clin Nutr.* 2014; 33 (1): 179-82.

5. Gayton A.K., Hall J. E. *Medical physiology.* Moscow: Logosfera; 2008. (in Russian)

6. Ivashkin V.T., Trukhmanov A.S., Maev I.V. Physiological basics of motor-evacuation function of the gastrointestinal tract. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii.* 2007; 5: 4-10. (in Russian)

7. Belyaeva I.A., Yatsyk G.V., Odinaeva N.D. New approaches to the correction of the neonatal gastrointestinal tract dysfunctions. *Gastroenterologiya Sankt-Peterburga.* 2008; 4: 14-8. (in Russian)

8. Costes LM, Boeckxstaens GE, de Jonge WJ, Cailotto C. Neural networks in intestinal immunoregulation. *Organogenesis.* 2013; 9(3):216-23.

9. Kulinskiy V. I. Neurotransmitters and the brain. *Soroskiy obrazovatel'nyy zhurnal.* 2001; 6: 11-6. (in Russian)

10. Nedashkovskiy E.V., Kuz'kov V.V., edition. *Basic course for anesthesiologist: Training manual.* Arkhangel'sk: Se-

vernyy gosudarstvennyy meditsinskiy universitet; 2010. (in Russian)

11. Ashmarin I.P., Stukalov V.P., ed. *Neurochemistry.* Moscow: Izd. Instituta biomeditsinskoy khimii RAMN; 1996. (in Russian)

12. Sem'yanov A.V, Kazantsev V.B. *Neuron-glia interactions in the brain. Educational materials for the training program "Storage and processing of information in biological systems".* Nizhniy Novgorod; 2007. (in Russian)

13. Sem'yanov A.V. *Features of GABAergic transmission and its modulation by heteroreceptors in field CA1 of the hippocampus.* Abstract of diss. Pushchino-London.; 2002. (in Russian)

14. Lychkova A.E. *Serotonergic regulation of the digestive system.* Moscow: Izdatel'stvo RAMN; 2012. (in Russian)

15. Partosoedarso E.R., Blackshaw L.A. Roles of central glutamate, acetylcholine and CGRP receptors in gastrointestinal afferent inputs to vagal preganglionic neurons. *Auton Neurosci.* 2000; 83(1-2):37-48.

16. Bloom S., Ghatei M., Bech P. Measurement of gut hormones in plasma. *Methods Mol Biol.* 2013;1065:147-70

17. Toyomasu Y., Mochiki E., Yanai M., Ogata K., Tabe Y., Ando H. et al. Intragastric monosodium L-glutamate stimulates motility of upper gut via vagus nerve in conscious dogs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010; 298(4): 1125-35.

18. Russell J., Cohn R. *Глутаминовая кислота. «VSD»;* 2012.

19. Nakamura E, Uneyama H, Torii K. Gastrointestinal nutrient chemosensing and the gut-brain axis: significance of glutamate signaling for normal digestion. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013; 28 (Suppl 4):2-8.

20. Nissim I. Newer aspects of glutamine/glutamate metabolism: the role of acute pH changes. *Am J Physiol.* 1999; 277 (4 Pt 2): 493-7.

21. Ruth M.R., Field C.J. The immune modifying effects of amino acids on gut-associated lymphoid tissue. *J Anim Sci Biotechnol.* 2013; 4(1): 27.

22. Skal'nyy A.V., Rudakov I.A., Notova S.V., Burtseva T.I., Skal'nyy V.V., Baranova O.V., Gubaydulina S.G. *Nutrition science: basic concepts and terms: a Glossary.* Orenburg: GOU OGU; 2005. (in Russian)

23. Pozdeev V.K., Pozdeev N.V. *Methods of neurochemical studies in clinic.* SPb.: Renome; 2013. (in Russian)

24. Karaban' I.N., Karaban' N.V., Karasevich N.V. *Glutamate receptors blockers (Neomidantan) in pathogenetic therapy of Parkinson's disease and other neurological diseases (Guidelines).* Kiev; 2009. (in Russian)

25. Ter'shina E.V. *Review on "Metabolic component rationale of the perfusion medium for the isolated brain."* Moscow; 2012. (in Russian)

26. Kitamura A., Tsurugizawa T., Uematsu A., Torii K., Uneyama H. New therapeutic strategy for amino acid medicine: effects of dietary glutamate on gut and brain function. *J Pharmacol Sci.* 2012; 118(2):138-44.

27. Blachier F., Boutry C., Bos C., Tome D. Metabolism and functions of L-glutamate in the epithelial cells of the small and large intestines. *Am J Clin Nutr.* 2009;90(3): 814-21.

28. Urazaev A.Kh., Nikol'skiy E.E., Malomuzh A.I. Glutamatergic modulation of vertebrate neuromuscular transmission. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal.* 2004; 8: 957-67. (in Russian)

29. Delgado TC. Glutamate and GABA in Appetite Regulation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:103

30. Linke N, Bodi N, Resch BE, Fekete E, Bagyanszki M. Developmental pattern of three vesicular glutamate transporters in the myenteric plexus of the human fetal small intestine. *Histol Histopathol.* 2008; 23(8):979-86.
31. Zhuravleva Z.N., Zhuravlev G.I., Ermakov A.A. Ultrastructural features of synaptic connections between neurons of the transplant and the brain of the recipient. *Modern problems of science and education.* 2010; 1: 7-11. (in Russian)
32. Matveeva N.Yu. Neurochemical specialization of retinal neurons. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal.* 2012; 2: 66-70. (in Russian)
33. Boldyrev A.A. Neuronal receptors in the immune system cells. *Priroda.* 2005; 7: 3-8. (in Russian)
34. Litvinenko I. V., Odinak M. I. Pathogenetic bases of cognitive and psychotropic disorders formation in Parkinson's disease. *Zhurn. nevrologii i psikhatrii im. S.S. Korsakova.* 2004; 4: 72-6. (in Russian)
35. Hornby P.J. Receptors and transmission in the brain-gut axis. II. Excitatory amino acid receptors in the brain-gut axis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001; 280(6):1055-60.
36. Tremolizzo L., Sala G., Zoia C.P., Ferrarese C. Assessing Glutamatergic Function and Dysfunction in Peripheral Tissues. *Curr Med Chem.* 2012; 19(9):1310-5.
37. Julio-Pieper M., O'Connor R.M., Dinan T.G., Cryan J.F. Regulation of the brain-gut axis by group III metabotropic glutamate receptors. *Eur J Pharmacol.* 2013; 698(1-3):19-30.
38. Gomazkov O.A. *Neurogenesis as an adaptive function of the brain.* Moscow: NII biomeditsinskoy khimii; 2014. (in Russian)
39. Vandenberg R.J., Ryan R.M. Mechanisms of glutamate transport. *Physiol Rev.* 2013; 93(4):1621-57.
40. Rutkevich S.A., Karavay T.V., Chumak A.G. The role of neuroactive amino acids in the intercellular interaction of neurons in the posterior horn of the spinal cord. *Trudy BGU.* 2008; 3 (1):14. (in Russian)
41. Jankovic S.M., Milovanovic D., Matovic M., Iric-Cupic V. The effects of excitatory amino acids on isolated gut segments of the rat. *Pharmacol Res.* 1999; 39(2):143-8.
42. Abramov Yu.B. Immunological aspects of central pain mechanisms. *Bol'.* 2009; 4: 2-8. (in Russian)
43. Davydova O.N., Boldyrev A.A. Glutamate receptors in nervous and immune system cells. *Annals of clinical and experimental neurology.* 2007; 4: 28-34. (in Russian)
44. Liu M.T., Rothstein J. D., Gershon M. D., Kirchgessner A. L. Glutamatergic Enteric Neurons. *J Neurosci.* 1997; 17: 4764-84.
45. Kirchgessner A.L. Glutamate in the enteric nervous system. *Curr Opin Pharmacol.* 2001; 1(6):591-6.
46. Giaronia C., Zanettia E., Chiaravallib A.M., Albarelloc L., Dominionio L., Capellac C. et al. Evidence for a glutamatergic modulation of the cholinergic function in the human enteric nervous system via NMDA receptors. *Eur J Pharmacol.* 2003; 476(1-2): 63-9.
47. Iwanaga T., Got M., Atanabe M. W. Cellular distribution of glutamate transporters in the gastrointestinal tract of mice. An immunohistochemical and in situ hybridization approach. *Biomedical Research.* 2005; 26 (6): 271-8.
48. Tong Q., Ma J., Kirchgessner A.L. Vesicular glutamate transporter 2 in the brain-gut axis. *Neuroreport.* 2001;12 (18):3929-34.
49. Malomuzh A.I. Glutamate receptors in vertebrate neuromuscular synapse. In the book: Il'inskikh N. N., ed. *Actual problems of biology, medicine and ecology. Collection of scientific papers, publication 1.* Tomsk; 2004. (in Russian)
50. Bondarenko V.M., Ryabichenko E.V. Pathogenetic mechanisms and principles of diseases treatment, associated with impaired intestinal-brain axis relationship. *Bulletin of the Orenburg scientific center, Ural branch of RAS (electronic journal).* 2013; 4. Available at: . (in Russian)
51. Ryabichenko E.V., Bondarenko V.M. Intestinal-brain relationships in norm and pathology. *Verkhnevolzhskiy meditsinskiy zhurnal.* 2013; 11 (1): 34-9. (in Russian)
52. Kaszaki J., Erces D., Varga G., Szabo A., Vecsei L., Boros M. Kynurenes and intestinal neurotransmission: the role of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Neural Transm.* 2012;119(2):211-23.
53. Milovanovic D.R., Jankovic S.M. A pharmacological analysis of the contractile effects of glutamate on rat and human isolated gut smooth muscle strips. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2002; 24(10):661-8.
54. Wang G.D, Wang X.Y, Xia Y., Wood J.D. Dietary glutamate: interactions with the enteric nervous system. *J Neurogastroenterol Motil.* 2014; 20(1):41-53.
55. Volova T. G. *Biotechnology.* Novosibirsk: Izd-vo Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy Akademii nauk; 1999. (in Russian)
56. Falaleeva T.M., Samonina G.E., Beregovaya T.V., Dzyubenko N.V., Andreeva L.A. Influence of glyprolines on structural-functional state of the gastric mucosa and body weight of the rats under prolonged administration of sodium glutamate. *Fuzika zhivogo.* 2010; 18 (1): 154-9. (in Russian)
57. Torii K., Uneyama H., Nakamura E. Physiological roles of dietary glutamate signaling via gut-brain axis due to efficient digestion and absorption. *J. Gastroenterol.* 2013; 48(4): 442-51.
58. Shilov Yu.E, Bezrukov M.V. Kynurenes in the pathogenesis of endogenous mental diseases. *Vestnik RAMN.* 2013; 1: 35-41. (in Russian)
59. Kaszaki J., Palasthy Z., Erczes D., Racz A., Torday C., Varga G. et al. Kynurenic acid inhibits intestinal hypermotility and xanthine oxidase activity during experimental colon obstruction in dogs. *Neurogastroenterol Motil.* 2008; 20(1):53-62.
60. Lourhmati A., Buniatian G. H., Paul C., Verleysdonk S., Buecheler R., Buadze M. et al. Age-Dependent Astroglial Vulnerability to Hypoxia and Glutamate: The Role for Erythropoietin. *PLoS One.* 2013; 8(10): e77182.
61. Hardingham G.E., Bading H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2010; 11(10): 682-96.
62. Lin C.L., Kong Q., Cuny G.D, Glicksman M.A. Glutamate transporter EAAT2: a new target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Future Med Chem.* 2012; 4(13): 1689-700.
63. Kaufman A. M., Milnerwood A.J., Sepers M.D., Coquinco A., She K., Wang L. et al. Opposing Roles of Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptor Signaling in Cocultured Striatal and Cortical Neurons. *J. of Neuroscience.* 2012; 32(12): 3992-4003.
64. Metallo C.M, Gameiro P.A., Bell E.L., Mattaini K.R., Yang J., Hiller K. et al. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature.* 2011; 481(7381):380-4.
65. Pisarenko O. I. *Participation of amino acids in the regulation of the heart muscle energy metabolism during ischemia and hypoxia.* Diss. Moscow; 1991. (in Russian)

66. Zielke H.R., Zielke C.L., Baab P.J. Direct measurement of oxidative metabolism in the living brain by microdialysis: a review. *J. Neurochem.* 2009;109 Suppl 1:24-9.
67. Fan J., Kamphorst J.J., Rabinowitz J.D., Shlomi T. Fatty acid labeling from glutamine in hypoxia can be explained by isotope exchange without net reductive isocitrate dehydrogenase (IDH) flux. *J Biol Chem.* 2013; 288(43):31363-9.
68. Stel'mashuk E.V., Novikova S.V., Isaev N.K. Influence of glutamine on the death of cultured granular neurons induced by glucose deprivation and chemical hypoxia. *Biokhimiya.* 2010; 75 (8): 1150-6. (in Russian)
69. Stobart J.L., Anderson C.M. Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply. *Front Cell Neurosci.* 2013; 7:38.
70. Welbourne T., Nissim I. Regulation of mitochondrial glutamine/glutamate metabolism by glutamate transport: studies with (15)N. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;280(5):C1151-9.
71. Kosenko E.A. *Energy metabolism in norm and at a pathology. The role of excitatory neurotransmitters.* Moscow: LENAND; 2014. (in Russian)
72. Rodionova O.N., Trubina N.V., Reutova E.Yu., Vidiker R.V., Babaeva A.R. Neurohumoral and cytokine imbalance in patients with functional diseases of the gastrointestinal tract. *Bulletin of the Volgograd scientific center of the RAMS.* 2008; 4: 44-6. (in Russian)
73. Glinnik S.V., Rineyskaya O.N., Romanovskiy I.V., Krasnenkova T.P. Content of free amino acids in rat brain and plasma with experimental hypothyroidism during heat stress. *Meditsinskiy zhurnal.* 2007; 3: 47-9. (in Russian)
74. Leibowitz A., Klin Y., Gruenbaum B.F., Gruenbaum S.E., Kuts R., Dubilet S. et al. Effects of strong physical exercise on blood glutamate and its metabolite 2-ketoglutarate levels in healthy volunteers. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2012; 72(4):385-96.
75. Zhou Y., Danbolt N.C. GABA and Glutamate Transporters in Brain. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013; 4: 165.
76. Romashchenko P.N., Maystrenko N.A., Silin N.A., Khrykov G.N., Strukov E.Yu. Yaroshenko A.M. Intraperitoneal microdialysis as a method for early detection of postoperative visceral ischemia. *Regional blood circulation and microcirculation.* 2012; 3: 39-44. (in Russian)
77. Timofeev I.S. Tissue microdialysis: principles and clinical application of the method in intensive care. *Intensive therapy.* 2007; 1. Available at: <http://icj.ru/journal/number1> — 2007. (in Russian)
78. Trufanov A. G. Magnetic resonance spectroscopy in the diagnosis of brain metabolic changes in ischemic stroke. Abstract of diss. Sankt-Peterburg; 2009. (in Russian)
79. Aleksandrova E.V. Syndromes of neurotransmitter systems dysfunction in the process of recovery of consciousness after severe craniocerebral injury. Abstract of diss. Moscow; 2013. (in Russian)
80. Umryukhin A.E. Antibodies to neurotransmitters in the mechanisms of stress behavioral reactions. Abstract of diss. Moscow; 2013. (in Russian)
81. Noworyta-Sokolowska K., Gorska A., Golembiowska K. LPS-induced oxidative stress and inflammatory reaction in the rat striatum. *Pharmacol Rep.* 2013; 65(4):863-9.
82. Wernerman J., Hammarqvist F., Botta D., Vinars E. Stress hormones alter the pattern of free amino acids in human skeletal muscle. *Clin Physiol.* 1993;13(3):309-19.
83. Hammarqvist F., Ejesson B., Wernerman J. Stress hormones initiate prolonged changes in the muscle amino acid pattern. *Clin Physiol.* 2001; 21 (1): 44-50.
84. Luo J.L., Hammarqvist F., Andersson K., Wernerman J. Skeletal muscle glutathione after surgical trauma. *Ann Surg.* 1996; 223(4):420-7.
85. Zil'ber A.P. *Clinical physiology in anesthesiology and resuscitation science.* Moscow, Meditsina; 1984. (in Russian)
86. Makkormik B, Nedashkovskiy E.V, Kuz'kov V.V., ed. *Fundamentals of intensive care. Manual of the World federation of societies of anaesthesiologists (WFSA).* Arkhangel'sk; 2014. (in Russian)
87. Privalova I.L. Intraorgan mechanisms of myoelectric activity and afferent reactions regulation of the stomach and duodenum. Abstract of diss. Moscow; 2006. (in Russian)
88. Knox D., Perrine S.A., George S.A., Galloway M.P., Liberzon I. Single prolonged stress decreases glutamate, glutamine, and creatine concentrations in the rat medial prefrontal cortex. *Neurosci Lett.* 2010; 480(1):16-20.
89. Boutry C., Matsumoto H., Bos C., Moinard C., Cynober L., Yin Y. et al. Decreased glutamate, glutamine and citrulline concentrations in plasma and muscle in endotoxemia cannot be reversed by glutamate or glutamine supplementation: a primary intestinal defect? *Amino Acids.* 2012; 43(4):1485-98.
90. Zaytsev O.S., Tsarenko S.V. *Neuro resuscitation science. Out of the coma (therapy postcomatose states).* Moscow: Littass; 2012. (in Russian)
91. Sabadash E. V., Skorniyakov S.N. Method of assessing the severity of tuberculosis infection. Patent RF, N 2305286; 2005. (in Russian)
92. Pouw E.M., Schols A.M., Deutz N.E., Wouters E.F. Plasma and muscle amino acid levels in relation to resting energy expenditure and inflammation in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158(3):797-801.
93. Rutten E.P., Engelen M.P., Wouters E.F., Schols A.M., Deutz N.E. Metabolic effects of glutamine and glutamate ingestion in healthy subjects and in persons with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83(1):115-23.
94. Vesali R.F., Klaude M., Rooyackers O., Wernerman J. Amino acid metabolism in leg muscle after an endotoxin injection in healthy volunteers. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005; 288(2): 360-4.
95. Clowes G.H. Jr., Randall H.T., Cha C.J. Amino acid and energy metabolism in septic and traumatized patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1980; 4(2):195-205.
96. Martinez M.J., Giraldez J. Plasma aminogram in critical patients. *Nutr Hosp.* 1993; 8(2):79-93.
97. Moroz V.V., Golubev A.M. Sepsis: principles of diagnosis. *Obshchaya reanimatologiya.* 2013; IX (6): 5-10. (in Russian)
98. Hansel G., Ramos D.B., Delgado C.A., Souza D.G., Almeida R.F., Portela L.V. et al. The Potential Therapeutic Effect of Guanosine after Cortical Focal Ischemia in Rats. *PLoS One.* 2014; 9(2): e90693.
99. Puig N., Davalos A., Adan J., Piulats J., Martinez J.M., Castillo J. Serum amino acid levels after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Cerebrovasc Dis.* 2000;10(6):449-54.
100. Cholinergic therapy in critical states of the central nervous system: proceedings of the VI National Congress of anaesthesiologists (18-21 September, Lvov). *Zdorov'e Ukrainy.* 2013; 12: 8-19. (in Russian)

101. Ameer N.H., Lee J.H., Choi M.A., Jin G.S., Kim M.S., Park B.R. The Effects of Glutamate NMDA Receptor Antagonist MK-801 on Gastrointestinal Motility after Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2010;14(3):151-6.
102. Petersen S.R., Jeevanandam M., Holaday N.J., Lubhan C.L. Arterial-jugular vein free amino acid levels in patients with head injuries: important role of glutamine in cerebral nitrogen metabolism. *J. Trauma.* 1996;41(4):687-94; discussion 694-5
103. Dai S.S., Wang H., Yang N., An J.H., Li W., Ning Y.L. et al. Plasma glutamate-modulated interaction of A2AR and mGluR5 on BMDCs aggravates traumatic brain injury-induced acute lung injury. *J. Exp Med.* 2013;210(4):839-51.
104. Kvaratskheliya M.V., Nagaeva E.V., Zverev D.V., Bagirova N.I., Peterkova V.A. Experience of treatment with recombinant human growth hormone undersized children with chronic kidney failure. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii.* 2008; 5:65-72. (in Russian)
105. Demin V.F., Klyuchnikov S.O., Rusnak F.I., Osmanov I.M. *Лекции по педиатрии. Том 6. Нефрология.* Moscow: RGMU; 2006. (in Russian)
106. Divino Filho J.C., Hazel S.J., Furst P., Bergstrom J., Hall K. Glutamate concentration in plasma, erythrocyte and muscle in relation to plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-1 and insulin in patients on haemodialysis. *J Endocrinol.* 1998;156(3):519-27.
107. Hack V., Stutz O., Kinscherf R., Schykowski M., Kellerer M., Holm E. et al. Elevated venous glutamate levels in (pre)catabolic conditions result at least partly from a decreased glutamate transport activity. *J Mol Med (Berl).* 1996;74(6):337-43.
108. Piton G., Manzoni C., Monnet E., Cypriani B., Barbot O., Navellou J.C. et al. Plasma citrulline kinetics and prognostic value in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2010; 36(4):702-6.
109. Alekseeva E.V., Popova T.S., Sal'nikov P.S., Baranov G.A., Pasechnik I.N. Electrical Activity of the Gastrointestinal Tract in Critically Ill Patients. *Obshchaya reanimatologiya.* 2013; IX (5): 45-55. (in Russian)
110. Caddell K.A., Martindale R., McClave S.A., Miller K. Can the intestinal dysmotility of critical illness be differentiated from postoperative ileus? *Curr Gastroenterol Rep.* 2011;13(4):358-67.
111. Alekseeva E.V., Popova T.S., Pasechnik I.N. Functional disorders of the gastrointestinal motility in critically ill patients. *Khirurgiya, zhurnal im. N.I. Pirogova.* 2013; 9: 73-8. (in Russian)

Received 20.02.15

Сведения об авторах:

Попова Т.С., доктор биол. наук, проф., руководитель лаб. экспериментальной патологии НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского

Сальников П.С., канд. мед. наук, анестезиолог-реаниматолог, зав. отд. анестезиологии и реанимации ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» УДП РФ

© Коллектив авторов, 2015

Пигаревский П.В.¹, Чирский В.С.², Аничков Н.М.³

К 130-летию со дня рождения крупного патолога академика АН и АМН СССР Николая Николаевича Аничкова

¹ — ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»

² — ФГБВОУ ВПО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ

³ — ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург

В статье представлен научный и жизненный путь выдающегося русского патолога, основателя учения об атеросклерозе академика Николая Николаевича Аничкова.

Ключевые слова: академик Н.Н. Аничков; атеросклероз; патологическая анатомия

Pigarevsky P.V.¹, Chirsky V.S.², Anichkov N.M.³

To the 130th anniversary since the birth of the prominent pathologist N.N. Anichkov, academician of USSR Academy of sciences and Academy of medical sciences

¹ — Institute of Experimental Medicine

² — Military Medical Academy named after S.M. Kirov, War Ministry of Russian Federation

³ — Northwestern State Medical University named after I.I. Mechnikov, Health Ministry of Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

The paper represents the research achievements and a course of life of the outstanding Russian pathologist, founder of the doctrine on atherosclerosis academician Nikolai Nikolayevich Anichkov.

Key words: academician N.N. Anichkov; atherosclerosis; pathological anatomy

Имя академика АН и АМН СССР, президента АМН СССР в 1946—1953 гг., генерал-лейтенанта медицинской службы, лауреата Сталинской премии Николая Николаевича Аничкова (1885—1964) входит в галерею имён крупных исследователей, которые прославили отечественную медицинскую науку. Об этом учёном опубликовано множество работ, вышедших в нашей стране и за границей [1—8]. Например, в книге двух известных исследователей М. Friedman, G.W. Friedland (США) «10 величайших открытий в медицине» работам Н.Н. Аничкова по атеросклерозу целиком посвящена восьмая глава [6]. Теории морфо- и патогенеза атеросклероза Н.Н. Аничкова видный американский кардиолог и патолог W. Dock сравнил со значением открытия Р. Кохом возбудителя туберкулеза [5]. Крупный биохимик D. Steinberg (США) писал в 2004 г.: «Если бы истинное значение его находок было своевременно оценено, мы сэкономили бы более 30 лет усилий по улаживанию полемики о холестерине, а сам Аничков мог бы быть удостоен» [8].

Начиная с 2007 г. Европейское общество по изучению атеросклероза (ЕАС) ежегодно проводит международные конгрессы. Конгрессы открываются Аничковскими чтениями, на которых присуждается Аничковская премия за самые выдающиеся исследования в области атеросклероза. Лауреат награждает-



Рис. 1. Н.Н. Аничков, 1947 г.

Для корреспонденции: Пигаревский Петр Валерьевич, доктор биол. наук, зав. отделом общей и частной морфологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», e-mail: pigarevsky@mail.ru

ся дипломом, медалью с изображением Николая Николаевича, получает 10 000 евро и выступает с планарной лекцией.

Кроме работ по сердечно-сосудистой патологии, перу Николая Николаевича принадлежат фундаментальные труды по проблемам ретикуло-эндотелиальной системы, инфекционной, военной патологии и патологической физиологии. Свыше 30 представителей его научной школы стали профессорами, а 11 чел. — членами АМН СССР и РАМН.

Н.Н. Аничков родился в Санкт-Петербурге в семье, относящейся к старинному дворянскому роду, имеющему более чем 700-летнюю историю, в небольшой степени связанную с Петербургом. Его отец Николай Милюевич Аничков был ом, сенатором, заместителем министра народного просвещения и в 1897—1898 гг. руководил министерством. Мать Николая Николаевича Л.И. Аничкова была дочерью известного священнослужителя И.В. Васильева, построившего православный Свято-Александро-Невский кафедральный собор на улице Дарю в Париже. Брат отца, Милий Милюевич, генерал-лейтенант, ветеран разных войн, был управляющим Царскосельскими дворцами, управляющим Императорским Гатчинским дворцом и комендантом г.Гатчина.

Николай Николаевич, пятый и младший ребёнок в семье, получив начальное домашнее образование, поступил в 3-ю классическую Санкт-Петербургскую губернскую гимназию. Окончив гимназию с золотой медалью, Н.Н. Аничков в 1903 г. поступил в Императорскую Военно-медицинскую академию. В этом привилегированном вузе учились студенты разных сословий и преподавали великие учёные: И.П. Павлов, В.М. Бехтерев, А.А. Максимов, С.П. Фёдоров, Г.И. Турнер, П.Ф. Лесгафт и др. Уже на втором курсе академии Николай Николаевич обнаружил интерес к научным изысканиям, заинтересовавшись патоморфологией. Его первыми научными наставниками в этой области стали выдающийся гистолог проф. А.А. Максимов и опытный патологоанатом проф. А.И. Моисеев.

К моменту окончания академии Николай Николаевич имел 4 научных публикации, и одна из них, называвшаяся «К вопросу о гистогенезе папиллярных опухолей яичника», была удостоена престижной премии Т.С. Иллинского. Премия носила имя первого заведующего кафедрой патологической анатомии академии, воспитавшего основателя петербургской школы патологоанатомов М.М. Руднева. Оказавшись в числе лучших выпускников, Н.Н. Аничков получил звание лекаря с отличием и занял должность институтского врача при кафедре патологической анатомии. Вскоре он стал изучать экспериментальный миокардит и своеобразие грануляционной ткани миокарда

при различных видах миокардита. В 1912 г. 27-летний врач защитил диссертацию на степень доктора медицины. Она называлась «О воспалительных изменениях миокарда (к учению о миокардите)» и после защиты была удостоена премии М.М. Руднева. В этой работе автор не только впервые детально проследил морфогенез экспериментального миокардита, но и описал особые клетки грануляционной ткани сердца, обладающие ядерным хроматином в виде «ламповой щётки» или «ёршика для мытья посуды». Позднее такие клетки, входящие, в частности, в состав ревматической гранулёмы сердца, получили название «миоцитов Аничкова», а в современной мировой литературе — «клеток Аничкова».

Ещё в 1909—1911 гг. Николай Николаевич и помогавший ему студент С.С. Халатов увлеклись изучением атеросклероза. К концу 1912 г. они оба создали экспериментальную (кроличью) модель атеросклероза, получившую впоследствии название «классической». Молодые исследователи вызывали у кроликов атеросклероз, скармливая им через желудочный зонд чистый холестерин, растворённый в подсолнечном масле. Продолжая работать на этой модели, Н.Н. Аничков подробно изучил морфогенез атеросклеротических поражений аорты и других органов подопытных животных. Уже тогда были получены первые данные о значении холестерина в патогенезе атеросклероза. Таким образом, ещё в начале XX века молодой учёный получил результаты, принесшие ему в дальнейшем мировую известность.

Военно-медицинская академия в то время посылала талантливых исследователей в известные центры за границу для научной работы, стажировки и усовершенствования. Расходы по командировке частич-



Рис. 2. Н.Н. Аничков студент 1-го курса ИВМА, 1903 г.

но, а иногда и полностью покрывались казой. В 1913—1914 гг. Н.Н. Аничков работал в Германии: вначале в Страсбурге у профессора Х. Киари, затем во Фрайбурге, в институте патологии университета им. Альберта-Людвига, который возглавлял известный немецкий учёный Людвиг Ашофф [2]. Работая у Ашоффа, Николай Николаевич продолжил эксперименты, начатые в академии и не только подтвердил ведущую роль липидов, главным образом холестерина, в формировании атеросклеротических бляшек, но и впервые сформулировал инфильтрационную теорию морфогенеза атеросклероза. Сутью этой теории была концепция стадийного проникновения (инфильтрации) липидов плазмы крови во внутреннюю оболочку артерий с последующим формированием вокруг отложений липидов соединительно-тканной «капсулы». Как известно, часть такой «капсулы» в виде фиброзной покрывки и создаёт атеросклеротическую бляшку в артерии. В частности, в инфильтрационной теории подчёркивалась роль фагоцитов, поглощающих холестерин и получивших позднее название пенных клеток. Кроме того, в Германии, начав с исследований «холестерин-эстер-фагоцитов» в органах ретикуло-эндотелиальной системы (РЭС), Николай Николаевич изучал гистофизиологию и патологию РЭС. В результате, его ранние работы, посвящённые «миоцитам», а также патологической анатомии экспериментального атеросклероза принесли ему международную известность [1, 2, 4].

Первая мировая война заставила Николая Николаевича срочно вернуться на родину. В Петрограде Н.Н. Аничков, как военный врач, был мобилизован и в течение полутора лет участвовал в боевых действиях на Западном фронте в качестве старшего врача полевого военно-санитарного поезда. Летом 1917 г. в свя-

зи с прекращением боёв в Галиции он вернулся в академию и в течение трёх лет работал врачом-прозектором и приват-доцентом кафедры патологической анатомии. В первые годы советской власти в медицинских вузах нашей страны продолжила своё развитие относительно новая теоретическая дисциплина — патологическая физиология (общая и экспериментальная патология). Некоторые специалисты, особенно обладавшие экспериментальным опытом, пришли в эту дисциплину из патологической анатомии. В 1920 г. Николай Николаевич был избран профессором и начальником кафедры патологической физиологии Военно-медицинской академии (ВМА). Параллельно Н.Н. Аничков стал заведовать отделом патологической анатомии Института экспериментальной медицины (ИЭМ).

В руководимых им коллективах Николай Николаевич продолжал морфологические и патофизиологические исследования по проблемам атеросклероза и ретикуло-эндотелиальной системы. Чтобы получить представление о распространении атеросклероза, Н.Н. Аничков и его сотрудники обрабатывали гигантский архивный материал больниц крупных городов СССР. Они впервые показали, что атеросклероз:

- в возрасте после 50 лет стоит на одном из первых мест в качестве причины смерти;
- не является простым и обязательным спутником старости;
- не служит проявлением изнашивания организма, а является заболеванием;
- при возникновении у молодых лиц (в том числе как наследственная форма) протекает особенно тяжело, достигая апогея в пожилом возрасте [1, 2, 4].

Представители растущей научной школы Николая Николаевича изучали вопросы пато- и морфогенеза различных инфекций и разные проблемы частной патологии. Сотрудники кафедры патологической физиологии ВМА под руководством Н.Н. Аничкова занимались исследованием кислородного голодания, кровопотери и рядом проблем военной медицины. Например, ставились сложные опыты в барокамерах и самолётах, поднимавших животных с огнестрельными ранениями на разную высоту. Было показано, что транспортировка таких животных возможна на высотах до 3000 м без применения специального оборудования. Возможность постановки обширных и дорогих опытов, прекрасная экспериментальная база, включавшая в себя оборудование, питомники с разными лабораторными животными, всевозможные инструменты — всё это иллюстрировало роль и помощь государства научной медицине [4].

В 1923 г. Николай Николаевич стал одним из организаторов I-го Всероссийского съезда патологов в Петрограде. Помимо него, на этом форуме высту-

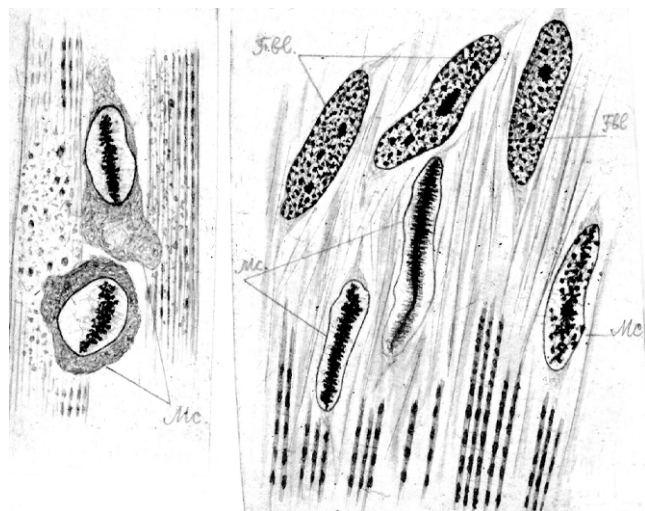


Рис. 3. Клетки Аничкова в строме миокарда. Рисунок автора, 1912 г.

пили с докладами крупные отечественные (А.И. Абрикосов, И.В. Давыдовский, А.А. Богомолец и др.) и зарубежные (Л. Ашофф, О. Любарш и др.) учёные. В этот период Н.Н. Аничков и его ученики не только развивали свои традиционные научные направления, но и касались целого ряда смежных проблем. Примером может служить работа Николая Николаевича «О явлениях набухания и сморщивания хондриозом». В ней автор впервые охарактеризовал процесс мутного набухания паренхимы органов в результате изменений митохондрий, и на эту работу, спустя 20 лет, ссылались американские учебники гистологии, приводившие оригинальные иллюстрации.

В 1924 г. Н.Н. Аничков сформулировал *комбинационную теорию патогенеза атеросклероза*. Она дополняла его прежнюю инфильтрационную теорию морфогенеза этой болезни и включала в себя воздействия на организм таких патогенетических факторов, как гипертензия, нарушения метаболизма, особенно липидного, условия местной гемодинамики, а также предшествующие местные воспалительные, травматические и метаболические (не липидные) поражения сосудов. В середине 20-х годов в лабораториях Николая Николаевича на основе обширных клинико-морфологических и экспериментальных работ был доказан системный характер атеросклероза, прослежены не только стадии развития, но также формы и волнообразный тип течения этого заболевания, в частности, варианты регресса. В 20—30 годы Н.Н. Аничков и его сотрудники исследовали морфологию и патогенез вторичных атеросклеротических изменений сердца и других органов, а также сосудистые и органные поражения при разной, в том числе эссенциальной, гипертензии (гипертонической болезни) [1, 2, 4].

Наряду с гипертрофией сердца были выделены следующие главные морфологические признаки гипертонии:

- гиперпластические утолщения внутренней оболочки мелких артерий (эластоз, эластофиброз);
- артериосклероз — гиалиноз, белковые отложения, плазматическое пропитывание стенок мелких артерий;
- атеросклероз, который при наличии гипертензии появляется в более раннем возрасте и в более выраженной форме.

В обеих лабораториях интенсивно изучалась одна из главных функций РЭС — способность макрофагов поглощать коллоидные вещества и взвеси из жидких сред организма. Исследования, посвящённые РЭС, осветили её важнейшие функции, участие клеток этой системы в тканевом обмене и различных процессах поглощения. Н.Н. Аничков опроверг представления о возможности блокады РЭС и показал,

что система в целом не может быть «заблокированной» коллоидными веществами и взвесями, что даже при «очень большой перегрузке» она сохраняет способность к поглощению. Было показано, что РЭС относится к важнейшим регуляторам гомеостаза и может быть подразделена на отделы применительно к циркуляции жидких сред. Эти первые детальные и комплексные исследования РЭС отражены в монографии Н.Н. Аничкова «Учение о ретикуло-эндотелиальной системе» (1930), Они заложили основы нынешнего понимания системы мононуклеарных фагоцитов. В 1928 г. Николай Николаевич издал первый в СССР учебник по патологической физиологии, который впоследствии выдержал 5 изданий и был переведен на некоторые иностранные языки [1, 2, 4].

Начиная с конца 20-х годов в лабораториях Н.Н. Аничкова проводились также систематические исследования морфогенеза экспериментальных инфекций: брюшного тифа, паратифа, менингококковых поражений. В частности, удалось показать значение энтерогенного пути возникновения брюшнотифозной инфекции, влияния вакцинации и поражений желчного пузыря на общее течение процесса. Важные результаты были получены при изучении бруцеллёза. Впервые была дана исчерпывающая морфологическая и морфодинамическая характеристика этой инфекции у человека и в эксперименте.

В дальнейшем эти исследования дополнились работами по коклюшу, гриппу, дизентерии и составили ещё одно крупное направление аничковской научной школы. Общим для всех работ этой школы по инфекционной патологии было выявление зависимости между реакциями организма хозяина и поведением патогенного агента. Массивный пласт исследований позволил позднее сформулировать концепцию внутриклеточного паразитирования, которую разрабатывал сотрудник Николая Николаевича проф. М.В. Войно-Ясенецкий.

Большой и отдельной ветвью «инфекционного направления» стали работы Н.Н. Аничкова, посвящённые аутогенной инфекции. Основным условием при изучении тех или иных аутоинфекционных процессов было уничтожение или повреждение защитных барьеров и механизмов макроорганизма. Изучались: плеврит при искусственном пневмотораксе, холецистит при повреждении фатерова соска, аппендицит при нарушении перистальтики, пневмонии при повреждении выстилки бронхов и др. [1, 2, 4].

В 30—40-е годы научная школа Николая Николаевича усиленно развивалась и уже включала в себя таких крупных патологов, как будущие академики АМН СССР В.Г. Гаршин, М.Ф. Глазунов, П.Н. Весёлкин, И.Р. Петров, Л.М. Шабад и др. На всесоюзных съездах патологов в Киеве (1927), Баку

(1930) и Москве (1934) Н.Н. Аничков избирался почётным делегатом или председателем съезда. Николай Николаевич неоднократно выступал с докладами на зарубежных конгрессах.

В 1934 г. вместе с другими профессорами ВМА Н.Н. Аничков удостоился военного генеральского звания. Он много занимался редакционной, научно-организационной и общественной деятельностью. Ряд работ он выполнил вместе со своим московским коллегой и другом, будущим академиком АН и АМН СССР А.И. Абрикосовым. Ещё в 1935 г. при деятельном участии их обоих возник журнал «Архив патологической анатомии и патологической физиологии», переименованный позднее в «Архив патологии». Николай Николаевич был ответственным редактором по разделам физиологии и медицины первых изданий Большой Советской и Большой медицинской энциклопедий и написал для них несколько статей. Он — создатель и первый руководитель кафедры патологической анатомии медицинского вуза, который после слияния с 2-м ЛМИ и ряда переименований, назывался в течение 20 лет Санкт-Петербургской государственной медицинской академией им. И.И. Мечникова. Он много и плодотворно работал как депутат Горсовета Ленинграда, член Верховных Советов РСФСР и СССР [1, 2, 4].

В 1937 г. известный немецкий учёный проф. Ф. Хофф выдвинул Н.Н. Аничкова номинантом на Нобелевскую премию по физиологии и медицине за открытие ведущей роли холестерина в развитии атеросклероза. Однако направить соответствующие документы было трудно, связи с зарубежными учёными были ограничены и строго поднадзорны, а Николай Николаевич незадолго до этого стал генералом Красной Армии. Много лет спустя за открытия метаболизма и регуляции холестерина Нобелевские премии были присуждены в 1964 г. К. Блоху (США) и Ф. Линеену (Германия), а в 1985 г. М.С. Брауну и Дж.Л. Голдстайну (США).

Помимо работ по прежним своим темам, Николай Николаевич в предвоенные годы руководил исследованиями по сравнительной и возрастной биологии и патологии. Он считал, что сравнительная патология должна развиваться в 4 основных направлениях:

- накопление материала и расширение наблюдений над спонтанными болезнями животного и растительного мира;
- сбор и обобщение данных палеопатологии;
- систематическое изучение основных патологических процессов у живых существ;
- сравнительные экспериментально-патологические исследования отдельных частных процессов (инфекционные болезни, опухоли, болезни обмена и др.) [1, 2, 6].

Он активно пропагандировал морфогенетическое направление в патологии. Его выражение «без морфогенеза нет патогенеза» стало крылатым в научном мире. В этой связи Д.С. Саркисов с соавт. описывают, как ещё в 1912 г. на заседании научного общества Н.Н. Аничков сделал доклад «Об экспериментальном миокардите». Председательствовал И.П. Павлов. По окончании заседания Павлов спросил, как докладчику удалось при изучении статических морфологических картин воссоздать морфодинамику воспалительного процесса. Николай Николаевич рассказал о принципах морфогенетических исследований, когда для стадийного изучения моделируемой болезни в каждый очередной срок эксперимента исследуются поражённые ткани животных — от самого начала до конца болезни [4].

Размышляя об определении и задачах патологической анатомии, он писал: «Патологическая анатомия, как обычно определяют эту науку, изучает нарушение строения органов и тканей «при болезнях» или «во время болезни». Мне кажется, что такое определение, чисто формального характера, неполно и неправильно передаёт основную задачу патоморфологии. Эта наука изучает не изменения строения органов и тканей «при болезнях», а сами болезни и лежащие в их основе патологические процессы...». По его словам, с одной стороны, необходимо полноценное, по возможности всестороннее микроскопическое изучение материала с применением широкого спектра современных методов. С другой стороны, нужна система подробной, точной и демонстративной регистрации и документации обнаруженных изменений.

Говоря о результатах экспериментальных работ Н.Н. Аничкова и его учеников, Д.С. Саркисов с соавторами указывают, что успехи в моделировании болезни человека не были для аничковской школы экспериментальными находками. Они базировались на следующих принципах:

- 1) наблюдение над естественным ходом соответствующей болезни у человека (на основе личного и «литературного» опыта);
- 2) идейный умысел (по И.П. Павлову), вытекающий из указанного наблюдения;
- 3) выбор экспериментальной модели;
- 4) заключение, определяющее научное и практическое значение эксперимента.

Понимая, что параллельное изучение сходных изменений при одной и той же нозологической форме у человека и подопытных животных является необходимым, Николай Николаевич и его ученики постоянно пользовались материалом из госпитальных лабораторий и прозектур [4].

Рассматривая вклад Н.Н. Аничкова в изучение общих вопросов патологии, следует коснуться некоторых

его трудов в области онкоморфологии. После первой статьи, посвящённой гистогенезу папиллярных опухолей яичников, учёный опубликовал работу о состоянии кровеносных сосудов в пересаженных опухолях мышей. В ней он выдвинул идею, что одной из причин отторжения опухолевого трансплантата является отсутствие ангиопластики в зоне пересадки. Эта идея перекликается с современными данными об ангиогенезе как важном факторе неопластического роста. Ему принадлежит целый ряд описаний частных, подчас редких онкопатологических форм: подкожных эпителиом головы, фибромиом пищеварительного тракта, тератоидных опухолей крестцовой области, нейробластом. Известны также его работы об экспериментальных (саркомы собак) и спонтанных (опухольи рыб) новообразованиях у разных организмов.

В 1931 г. Николай Николаевич сделал программный доклад «Об этиологии опухолей» на I Всесоюзном съезде онкологов. Уже тогда в этом докладе были подняты такие, актуальные до сих пор, проблемы, как мутации и канцерогенез, роль микроокружения и нарушения дифференцировки клеток в опухолевом росте. К животрепещущим проблемам онкологии он возвращался еще в 1953 г. на открытии совещания по вопросам этиологии и патогенеза опухолей [1, 2, 4].

В 1939 г. Н.Н. Аничков был избран академиком АН СССР. В это же время он передал кафедру патологической физиологии своему ученику, будущему академику АМН СССР И.Р. Петрову, а сам возглавил кафедру патологической анатомии ВМА, сохраняя руководство одноимённым отделом в ИЭМ.

Во время Великой Отечественной войны генерал-лейтенант медицинской службы, академик АН СССР Н.Н. Аничков находился в Самарканде, где ВМА была дислоцирована в период с 1941 по 1944 гг. На базе крупной больницы он организовал работу кафедры патологической анатомии. При этом основной темой научных разработок стала проблема инфекционной патологии, что было обусловлено интересами медицинской службы.

Его сотрудники, профессора А.А. Васильев, организатор патологоанатомической службы в армии, погибший под Сталинградом, и М.Ф. Глазунов, работали главными патологоанатомами Красной Армии. Как член Ученого совета Главного военно-санитарного управления Красной Армии Николай Николаевич также много занимался научно-практическими и организационными вопросами военной медицины. Кроме того, в 1944 г. А.И. Абрикосов и Н.Н. Аничков издали руководство «Частная патологическая анатомия. Ч. 2. Сердце и сосуды». За этот труд авторы были удостоены Сталинской премии I-й степени.

В 1944 г. была сформирована Академия медицинских наук СССР. Её первый президент акад.

Н.Н. Бурденко находился на этом посту около двух лет. Н.Н. Аничков был избран вторым президентом и работал в этой должности около 7 лет (1946—1953 гг.). Это были годы становления академии, тяжёлые не только в экономическом, организационном, но и политическом смысле. Вместе с коллегами Николай Николаевич остро переживал кадровые потери в результате репрессий (аресты В.В. Парина, С.С. Юдина, Л.С. Штерн и др.), антинаучную травлю физиологов в 1950 г., давление разных псевдонаучных фигур. Он держался достойно. В тот самый сложный период и президент, и президиум сохранили высокую работоспособность академии. В течение этого времени: сформировались отделения АМН СССР, было создано Ленинградское бюро. Был создан ряд научных медицинских журналов [1, 2, 4].



Рис. 4. Н.Н. Аничков на заседании Учёного совета ГВСУ в Москве, 1942 г.



Рис. 5. Академики АН СССР А.И. Абрикосов и Н.Н. Аничков, 1947 г.

В годы работы Николая Николаевича президентом академия пополнилась большим отрядом молодых и талантливых профессоров. Блестящие учёные работали в составе президиума академии: А.И. Абрикосов, П.К. Анохин, Н.Н. Жуков-Вережников, П.А. Куприянов, А.А. Мясников, И.П. Разенков, С.Е. Северин, Н.А. Семашко и др.

В течение своей деятельности на посту президента АМН СССР Николай Николаевич жил в Москве, но регулярно бывал в Ленинграде. Ему пришлось отказаться от руководства кафедрой в ВМА и демобилизоваться, но он сохранил за собой должность заведующего отделом патологической анатомии ИЭМ. Он постоянно контролировал работы в этом отделе и активно в них участвовал. Один из результатов его исследований, выполненных в то время — монография «Морфология заживления ран» (1951 г., в соавт. с К.Г. Волковой и В.Г. Гаршиным).

В декабре 1953 г. общее собрание VIII сессии АМН СССР удовлетворило просьбу Н.Н. Аничкова об освобождении его от должности президента по состоянию здоровья — он недавно перенёс третий инфаркт миокарда — и объявило ему благодарность. Николай Николаевич вернулся в ИЭМ, где до конца своих дней возглавлял отдел патологической анатомии. В течение этих 11 лет он опубликовал большую серию работ, посвящённых дальнейшему развитию учения об атеросклерозе и атеросклеротических поражениях сердца, а также об аутогенной инфекции. Часть этих трудов была опубликована в ФРГ и США. Как и прежде, для работ самого Н.Н. Аничкова и его учеников были характерны:

- обширные морфодинамические исследования,
- изучение форм и осложнений основного патологического процесса,
- широкий сравнительный подход (сопоставление с нормой, учёт возрастных и видовых изменений,
- сопоставление экспериментальных данных с патологией человека, системное изучение),
- применение комплекса современных методик,
- тщательная регистрация и документация результатов [1, 2, 4].

Научная школа Николая Николаевича систематически пополнялась многими способными молодыми исследователями. Научные идеи выдающегося ученого получили свое продолжение в работах его учеников и последующих поколений исследователей вплоть до наших дней. Если говорить о Санкт-Петербурге, то необходимо отметить, что эти идеи получили творческое развитие, прежде всего, в Институте экспериментальной медицины, благодаря трудам таких исследователей, как А.Н. Климов, В.А. Нагорнев, Ю.Н. Зубжицкий, Т.А. Сеницина, А.Д. Денисенко, П.В. Пигаревский. В 70-е годы прошлого века этими ис-

следователями был установлен принципиально важный факт, что липопротейды проникают в сосудистую стенку в виде целых интактных частиц [9].

С середины XX века и по настоящее время во всем мире большое внимание уделяется изучению роли иммунологических факторов в атерогенезе. Без всякого преувеличения пионерами в этой области является Ленинградско-Петербургская школа исследователей из Института экспериментальной медицины. Именно этой школой под руководством А.Н. Климова и В.А. Нагорнева была сформулирована аутоиммунная теория атеросклероза, которая впоследствии получила признание во всем мире, была зарегистрирована в качестве открытия в 1981 году №249, а ее авторы удостоены Государственной премии Российской Федерации [9].

Благодаря указанным работам атеросклероз стал рассматриваться как хроническое иммунное воспаление. При этом сегодня не умаляется и ключевая роль накопления в интиме артерий избыточных количеств холестерина. По образному выражению D. Steinberg [8], гиперхолестеринемия и воспаление — «партнеры одного и того же преступления».

Развитие иммунного воспаления в сосудистой стенке при атеросклерозе возможно при условии функциональных перестроек в иммунокомпетентных тканях. Наиболее фундаментальные исследования в этом направлении были осуществлены заведующим лабораторией атеросклероза им. Н.Н. Аничкова и Отделом общей и частной морфологии Института экспериментальной медицины доктором биологических наук П.В. Пигаревским. Показано, что нестабильные, отличающиеся прогрессирующим ростом атеросклеротические поражения артерий человека являются причиной абсолютного большинства острых клинических осложнений атеросклероза и ИБС [10].

Изучение иммунологических аспектов атеросклероза носит не только фундаментально-теоретический характер, но имеет также практическое значение. Выявление сенсibilизации лимфоцитов к перекисно-модифицированным липопротейдам низкой плотности (ЛПНП), сопровождающейся образованием соответствующих иммунных комплексов, открыло перспективы для разработки и использования нового подхода к лечению больных ишемической болезнью сердца и других осложнений атеросклероза, основывающихся на применении иммунокорректирующей терапии. При этом авторы, стоявшие у истоков этого направления — А.Н. Климов, В.А. Алмазов, В.А. Нагорнев, Р.П. Огурцов, А.Д. Денисенко, П.В. Пигаревский, подчеркивают, что иммунокорректирующая терапия должна рассматриваться как дополнительный подход к лечению больных ИБС на фоне других применяемых средств [4, 9—11].

Говоря о современных этапах исследований атеросклероза в Санкт-Петербурге, нельзя не упомянуть об инфекционно-обусловленной форме заболевания, при которой на первое место выступают облигатные паразиты (преимущественно *Chlamydia pneumoniae*, *Cytomegalovirus*). Об этой форме атеросклероза говорили в основном в последнее десятилетие. Показано, что в присутствии инфекционного агента течение атеросклероза принимает «злокачественную» направленность, т.е. быстро прогрессирует даже при нормальном уровне холестерина в крови [10].

Трудно назвать какое-либо другое заболевание, в отношении которого выдвинуто столь много теорий, гипотез, предположений, как атеросклероз. Однако, следует помнить, что в основе учения об атеросклерозе стояла и всегда будет стоять инфильтрационно-комбинационная теория Н.Н. Аничкова. Эволюцию этой концепции можно представить следующим образом:

- без холестерина не может быть атеросклероза (Н.Н. Аничков, 1913);
- концентрация плазменного холестерина коррелирует с опасностью развития атеросклероза (1920—1940 гг.);
- липопротеиды, как носители холестерина, ответственны за развитие атеросклероза (1940—1960 гг.);
- липопротеиды низкой и очень низкой плотности являются атерогенными, а липопротеиды высокой плотности являются антиатерогенными и защищают организм от атеросклероза (1960—1980 гг.);
- модифицированные ЛПНП в первую очередь ответственны за развитие атеросклероза (с 1980 г. — по настоящее время) [9].

Эволюция «холестериновой концепции» атерогенеза будет продолжаться и дальше. Причем, основа этой концепции — участие холестерина в патогенезе атеросклеротических поражений, вряд ли претерпит изменения.

Таким образом, академик АН и АМН СССР, президент АМН СССР (1946—53), генерал-лейтенант медицинской службы, лауреат Сталинской премии I-й степени, кавалер трёх орденов Ленина и многих других наград. Николай Николаевич был членом 9 зарубежных научных академий и королевских научных обществ. Как уже отмечалось, в его научной школе воспитано более 30 профессоров и 11 членов АМН СССР и РАМН.

В редакционной статье «Архива патологии» в 2005 г. указывается, что современники отзывались об этом учёном как о мудром, уравновешенном, чрезвычайно работоспособном и инициативном человеке. Строгость и требовательность разумно сочетались в нём с демократичностью и благожелательностью. Скромность, самодисциплина и педагогический та-



Рис. 6. Мемориальные доски на зданиях ВМА и НИИЭМ, установленные в 1950-е (слева) и 1960-е годы.

лант Николая Николаевича имели большую воспитательную силу. Знаток русской литературы, музыки и истории, он любил природу, домашних животных. В редкие свободные часы в его гостеприимный дом приглашались друзья, сотрудники, ученики [3].

Тёплые, дружеские отношения связывали Николая Николаевича с его московским коллегой академиком А.И. Абрикосовым. Бывая в Москве, он часто останавливался в доме Алексея Ивановича и в свою очередь отвечал гостеприимством при визитах А.И. Абрикосова в Ленинград. В письмах к внуку Николая Николаевича Н.М. Аничкову в 1984 году об этом вспоминал сын Алексея Ивановича, известный физик и будущий лауреат Нобелевской премии А.А. Абрикосов [1, 2, 4].

В первом браке у Николая Николаевича был сын Аничков Милий Николаевич (1920—1991), ставший видным военным хирургом, профессором, руководителем ряда организаций.

Память об этом крупном деятеле науки увековечена не только в его трудах и учениках. В Санкт-Петербурге на двух зданиях, где в разные годы работал Н.Н. Аничков — Военно-медицинской академии и Института экспериментальной медицины — установлены мемориальные доски. Его имя носит лаборатория атеросклероза ГУ НИИЭМ РАМН.

Список литературы

1. Аничков Н.М. Первооткрыватель в патологии. К 125-летию со дня рождения академика Н.Н. Аничкова. *Вестник РАН*. 2010; 11: 1005-12.
2. Аничков Н.М. *12 очерков по истории патологии и медицины*. СПб: Синтез бук; 2013; 239 с.
3. К 120-летию со дня рождения академика АН и АМН СССР Н.Н. Аничкова (редакционная). *Арх. патол.* 2005; 5: 3-6.
4. Саркисов Д.С., Пожарисский К.М., Аничков Н.М. *Н.Н. Аничков*. М.: Медицина; 1989; 208 с.
5. Dock W. Research in Atherosclerosis — The First Fifty Years. *Ann. Intern. Med.* 1958; 49: 699-705.
6. Friedman M., Friedland G.W. *Medicine's 10 Greatest Discoveries*. New Haven-London: Yale Univ. Press; 1998; 701 p.

7. *Konstantinov I.E., Mejevoi N., Anichkov N.M.* Nikolai N. Anichkov and His Theory of Atherosclerosis. *Texas Heart Inst. J.* 2006; 33: 417-23.

8. *Steinberg D.* An interpretive history of the cholesterol controversy. *J. Lipid Res.* 2004; 45: 1583-93.

9. *Нагорнев В.А.* Патогенез атеросклероза. СПб: Хромис; 2006; 240 с.

10. *Пигаревский П.В., Мальцева С.В., Снегова В.А., Давыдова Н.Г.* Роль интерлейкина-18 в дестабилизации атеросклеротической бляшки у человека. *Бюл. экспер. биол. и мед.* 2014; 6: 796-801.

11. *Hansson G.K.* Vaccination against atherosclerosis, science of fiction. *Circulation.* 2002; 106 (3): 337-56.

Поступила 21.04.15

References

1. Anichkov N.M. The founder of pathology. By the 125 anniversary since the birth by the academician N.N. Anichkov. *Vestnik Russian Academy of Science.* 2010; 11: 1005-12.

2. *Anichkov N.M.* About 12 essays of stories of pathology and medicine. SPb: Synthesis book; 2013; 239 p.

3. By the 120 anniversary since the birth of N.N. Anichkov, the academician of Academy of Science and the Acade-

my of Medical Sciences USSR (editorial). *Arkhiv Patologii.* 2005; 5: 3-6.

4. *Sarkisov D.S., Pozharissky K.M., Anichkov N.M. N.N.* *Anichkov.* M.: Medicine; 1989; 208 p.

5. *Dock W.* Research in Atherosclerosis — The First Fifty Years. *Ann. Intern. Med.* 1958; 49: 699-705.

6. *Friedman M., Friedland G.W.* *Medicine's 10 Greatest Discoveries.* New Haven- London: Yale Univ. Press; 1998; 701 p.

7. *Konstantinov I.E., Mejevoi N., Anichkov N.M.* Nikolai N. Anichkov and His Theory of Atherosclerosis. *Texas Heart Inst. J.* 2006; 33: 417-23.

8. *Steinberg D.* An interpretive history of the cholesterol controversy. *J. Lipid Res.* 2004; 45: 1583-93.

9. *Nagornev V.A.* *Pathogenesis of atherosclerosis.* SPb: Hromis; 2006; 240 p.

10. *Pigarevskii P.V., Maltseva S.V., Snegova V.A., Davydova N.G.* Role of interleukin-18 in destabilization of the atherosclerotic plaque in humans. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2014; 6: 796-801.

11. *Hansson G.K.* Vaccination against atherosclerosis, science of fiction. *Circulation.* 2002; 106 (3): 337-56.

Received 21.04.15

Сведения об авторах:

Чирский Вадим Семёнович, ФГБВОУ ВПО ВМА им. С.М. Кирова МО РФ, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической анатомии

Аничков Николай Мильевич, ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова» Минздрава России, доктор мед. наук, проф., заслуженный деятель науки РФ, член-корр. РАН, зав. каф. патологической анатомии