

**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.jppt.net  
E-mail: path.physiol@yandex.ru

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

ЛР №010215 от 29.04.97.

Издатель: ООО «Гениус Медиа»  
E-mail: genius-media@mail.ru

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

**ИФ РИНЦ 2013 0,600**

**Журнал включен в базу данных Scopus**

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

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

Сдано в набор 10.12.2015 г.  
Подписано в печать 21.12.2015 г.

ISSN 0031-2991  
Пат. физиол. и экспер. тер.  
2015. Том 59. № 4. 1–116.

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, № 4, 2015**

Октябрь—декабрь

## 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),  
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

ИФ РИНЦ 2013 0,600

ISSN 0031-2991  
Pathological  
physiology  
and experimental  
therapy  
2015. Vol. 59. № 4. 1–116.

Moscow

© ООО «Гениус Медиа», 2015.

THE INSTITUTE OF GENERAL PATHOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY

# PATOLOGICHESKAYA FISIOLOGIYA I EKSPERIMENTAL'NAYA TERAPIA

*Pathological physiology and experimental therapy*

*Quarterly reviewed science and practical journal  
Published since 1957*

**Vol. 59, № 4, 2015**

October—December

**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),  
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

- Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н., Орлова И.Н.** Ранняя социальная изоляция увеличивает агрессивность и нарушает кратковременное привыкание у крыс . . . . . 4
- Круглов С.В., Терехина О.Л., Смирнова Е.А., Кашаева О.В., Белкина Л.М.** Антиаритмическое действие олигонуклеотидов сопровождается активацией синтеза белка теплового шока HSP70 в сердце у крыс . . . . . 16
- Левин Г.Я., Сухарева Е.Г., Егорихина М.Н.** О Роли микровезикуляции эритроцитов и гликирования гемоглобина в гемореологических нарушениях при ожоговой болезни . . . . . 21
- Тихомирова Л.Н., Сафина Н.Ф., Тараканов И.А.** Роль опиоидергической и ГАМКергической систем в регуляции механочувствительности дыхательной системы у крыс . . . . . 26
- Волков Е.Е., Извольская М.С., Воронова С.Н., Василенко А.М., Волков А.Е.** Новая фитотерапевтическая композиция для восстановления костной и хрящевой тканей. Экспериментальное исследование. . . . . 30
- Елистратова И.В., Морозов С.Г., Захарова И.А., Тарасова М.В.** Люминол-зависимая хемилуминесценция лейкоцитов периферической крови больных atopическим дерматитом при различной тяжести течения заболевания . . . . . 35
- Титов Е.А., Соседова Л.М., Новиков М.А.** Альтерация ткани головного мозга белых крыс, индуцированная воздействием наноконструкта серебра, инкапсулированного на полимерной матрице . . . . . 41
- Кожевникова Л.М., Цорин И.Б., Варков А.И., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Колик Л.Г., Суханова И.Ф., Крыжановский С.А.** Реактивность сосудов и экспрессия рецепторов эндогенных вазоконстрикторов у крыс с алкогольной кардиомиопатией и изоляционным стрессом . . . . . 45
- Скальный А.А., Тиньков А.А., Медведева Ю.С., Алчинова И.Б., Бонитенко Е.Ю., Карганов М.Ю., Никоноров А.А.** Состояние гомеостаза цинка и показатели мышечной деятельности при экспериментальной дозированной физической нагрузке на фоне введения аспарагината цинка . . . . . 58
- Байгозина Е.А., Долгих В.Т., Совалкин В.И.** Полиморфизм генов семейства интерлейкина-1 как фактор патогенеза нозокомиальной пневмонии . . . . . 66
- Горячева А.В., Терехина О.Л., Абрамочкин Д.В., Буданова О.П., Белкина Л.М., Смирин Б.В., Дауни Г.Ф., Малышев И.Ю., Манухина Е.Б.** Влияние адаптации к гипоксии на экспрессию изоформ NO-синтазы в миокарде . . . . . 73
- Иванов Ю.Д., Мальсагова К.А., Татур В.Ю., Веснин С.Г., Иванова Н.Д., Зиборов В.С.** СВЧ-излучение воды в аналитических системах . . . . . 78
- Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Ястребов А.П.** Влияние экстремальных факторов на хоуминг мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток . . . . . 82
- Аниховская И.А., Двоеносов В.Г., Жданов Р.И., Кубатиев А.А., Майский И.А., Маркелова М.М., Мешков М.В., Опарина О.Н., Салахов И.М., Яковлев М.Ю.** Психосоциальный стресс как клиническая модель начальной фазы общего адаптационного синдрома . . . . . 87
- Белюсова Е.С., Микашинович З.И., Саркисян О.Г.** Гипоксия как патофизиологическая основа изменения метаболических процессов в эритроцитах и гепатоцитах крыс после длительного приёма симвастатина (зокора). . . . . 93
- Баев В.М., Кудрявцева Е.Н.** Адаптация к физической нагрузке и состояние вегетативной нервной системы у молодых женщин с низким артериальным давлением . . . . . 97

### ОБЗОРЫ

- Решетняк В.К., Кукушкин М.Л., Гурко Н.С.** Патогенетические механизмы фантомно-болевого синдрома . . . . . 101
- Пальцын А.А., Комиссарова С.В.** Возрастные изменения мозга . . . . . 108

## CONTENTS

### ORIGINAL ARTICLES

- Krupina N.A., Khlebnikova N.N., Orlova I.N.** Early social isolation increases aggression and impairs a short-term habituation in acoustic startle reflex in rats
- Kruglov S.V., Terekhina O. L., Smirnova E.A., Kashaeva O.V., Belkina L.M.** Antiarrhythmic effect of oligonucleotides accompanied by activation of HSP70 protein in the heart of rats
- Levin G.Ya., Sukhareva E.G., Egorihina M.N.** The role of erythrocyte microvesiculation and hemoglobin glycation in hemoreological disorders during burn injury
- Tikhomirova L.N., Safina N.F., Tarakanov I.A.** The role of opioidergic and GABAergic systems in the mechanosensitivity regulation of the respiratory system in rats
- Volkov E.E., Izvol'skaya M.S., Voronova S.N., Vasilenko A.M., Volkov A.E.** New phytotherapeutic composition for restoring bone and cartilage. Experimental study
- Elistratova I.V., Morozov S.G., Zakharova I.A., Tarasova M.V.** Peripheral blood cells luminol-dependent chemiluminescence at the different stages of atopic dermatitis
- Titov E.A., Sosedova L.M., Novikov M.A.** Alteration of white rats brain tissue induced by assessment of silver nanocomposite encapsulated in polymer matrix
- Kozhevnikova L.M., Tsorin I.B., Varkov A.I., Stolyaruk V.N., Vititnova M.B., Kolik L.G., Sukhanova I.F., Kryzhanovskii S.A.** Vascular reactivity and receptor expression of endogenous vasoconstrictor in rats with alcoholic cardiomyopathy and insulation stress
- Skalny A.A., Tinkov A.A., Medvedeva Yu.S., Alchinova I.B., Bonitenko E.Yu., Karganov M.Yu., Nikonorov A.A.** Zinc homeostasis and indicators of muscle activity in experimental graduated exercise on the background of zinc asparaginate
- Baygozina E.A., Dolgih V.T., Sovalkin V.I.** Polymorphism of genes of interleukin-1 family as factor of pathogenesis of nozokomialny pneumonia
- Goryacheva A.V., Terekhina O.L., Abramochkin D.V., Budanova O.P., Belkina L.M., Smirin B.V., Downey H.F., Malyshev I.Yu., Manukhina E.B.** Effect of adaptation to hypoxia on expression of NO synthase isoforms in rat myocardium
- Ivanov Yu.D., Malsagova K.A., Tatur V.Yu., Vesnin S.G., Ivanova N.D., Ziborov V.S.** Microwave emission from water in bioanalytical systems
- Maklakova I.Yu., Grebnev Y.D., Yastrebov A.P.** The influence of extreme factors on homing multipotent mesenchymal stromal cells
- Anikhovskaya I.A., Dvoenosov V.G., Zhdanov R.I., Koubatiev A.A., Mayskiy I.A., Markelova M.M., Meshkov M.V., Oparina O.N., Salakhov I.M., Yakovlev M.Yu.** Emotional stress as a clinical model to study the pathogenesis of the initial phase of the general adaptation syndrome
- Belousova E.S., Mikashinowich Z.I., Sarkysjan O.G.** Hypoxia as functional base of metabolic processes changes in erythrocytes and hepatocytes of rats after prolonged Simvastatin (Zokor) intake
- Baev V.M., Kudryavtseva E.N.** Adaptation to physical load and the state of the autonomic nervous system in young women with low blood pressure

### REVIEWS

- Reshetnyak V.K., Kukushkin M.L., Gurko N.C.** Pathogenetic mechanisms of phantom-pain syndrome
- Paltsyn A.A., Komissarova S.V.** Age-related changes of the brain

Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н., Орлова И.Н.

## **Ранняя социальная изоляция увеличивает агрессивность и нарушает кратковременное привыкание у крыс**

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

*Длительная социальная изоляция в раннем онтогенезе приводит к различным изменениям поведения и когнитивной дисфункции у взрослых крыс, однако данные о нарушениях противоречивы. В настоящей работе изучены последствия ранней социальной изоляции у крыс Вистар по показателям психомоторной активности, агрессивности, тревожности, депрессивноподобного поведения, сенсомоторной реактивности и кратковременного привыкания в акустическом стартл-рефлексе. На 24-й постнатальный день крыс отлучали от матери и содержали по одной в клетке в течение девяти последующих недель. Поведение животных оценивали в возрасте одного, двух и трех месяцев. Сразу после отлучения от матери крысы опытной группы не отличались от контроля ни по одному из показателей. После четырех недель социальной изоляции крысы демонстрировали усиление агрессивности в тесте зоосоциального взаимодействия. У крыс, подвергнутых 8-недельной социальной изоляции, повышенная агрессивность сопровождалась усилением активного неагрессивного взаимодействия на фоне незначительного увеличения двигательной активности в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ). Ни на одном из сроков обследования крысы, содержащиеся изолированно, не отличались от контрольных животных по показателям тревожности в ПКЛ, по тревожно-фобическому уровню, который определяли в батарее тестов, и по длительности иммобильности, характеризующей депрессивность в тесте принудительного плавания. Через 8 нед. изоляции крысы увеличивали суточное потребление жидкости за счет усиления потребления сахарозы. Через 9 нед. изоляции амплитуда акустического стартл-ответа и его предстимульное торможение, характеризующее состояние сенсомоторного входа, не отличались от контрольных значений, однако кратковременное привыкание в акустическом стартл-рефлексе было нарушено. По полученным данным крыс Вистар, подвергнутых длительной социальной изоляции, можно рассматривать как модель повышенной агрессивности с признаками когнитивного дефицита по показателям неассоциативного обучения в акустическом стартл-рефлексе.*

**Ключевые слова:** крысы; социальная изоляция; двигательная активность; агрессия; сенсомоторная реактивность; кратковременное привыкание; акустический стартл-ответ; тревожность; депрессивноподобное состояние.

**Для цитирования:** Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015; 59(4): 4-15.

Krupina N.A., Khlebnikova N.N., Orlova I.N.

## **Early social isolation increases aggression and impairs a short-term habituation in acoustic startle reflex in rats**

Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8, Baltiyskaya str., 125315 Moscow, Russia

*Prolonged social isolation in early ontogeny leads to various changes in behavior and cognitive dysfunction in adult rats; however, data on the disorders are contradictory. In the present work, we studied the effects of early social isolation in Wistar rats by indices of psychomotor activity, aggression, anxiety, depression-like behavior, sensorimotor reactivity and short-term habituation of acoustic startle reflex. On the 24th postnatal day, rats were weaned from the dams and housed in individual cages for nine consecutive weeks. Animal behavior was evaluated at the age of one, two and three months. Immediately after weaning from the dam rats in the experimental group did not differ from the control on any of the indices. After four weeks of social isolation, rats showed an increased aggression in the social contact test. In rats isolated for an 8-weeks period, the increase in active non-aggressive contacts with a slight increase in motor activity in the elevated plus maze (EPM) accompanied increased aggression. At any terms of examination, isolated rats did not differ from the control in the anxiety in EPM, in the anxiety-phobic score, which is evaluated in a battery of tests, and in the duration of immobility which characterizes depression in the forced swimming test. Rats isolated for an 8-weeks period increased daily liquid intake by increasing the consumption of sucrose. After nine weeks of isolation, basal startle amplitude and prepulse inhibition that is, the characteristics of sensorimotor gating did not differ from the control, but there was a lack of short-term*

**Для корреспонденции:** Крупина Наталья Александровна, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы, e-mail: krupina-na@yandex.ru

*habituation of the acoustic startle reflex. Based on the data obtained, Wistar rats subjected to prolonged social isolation can be seen as a model of increased aggression with signs of cognitive deficits by indices of non-associative learning in the acoustic startle reflex.*

**Keywords:** rats; social isolation; locomotion; aggression; sensorimotor reactivity; short-term habituation; acoustic startle response; anxiety; depression-like behavior

**For citation:** *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya. 2015 59(4) 4-15.*

**For correspondence:** *Krupina N.A., e-mail: krupina-na@yandex.ru*

Аффективные расстройства часто являются результатом нарушения развития нервной системы, вызванного эпигенетическими нарушениями в раннем онтогенезе (neurodevelopmental disorders) под влиянием авersive событий разного характера [1—3]. Эпигенетические нарушения уже в раннем периоде проявляются целым рядом изменений, включая нейроэндокринные изменения, в первую очередь, в гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системе (ГГА-) системе, нейроиммунные изменения, а также поведенческую дисфункцию, что ведет к нарушениям эмоционально-мотивационного поведения у взрослых животных [4—7]. Наиболее частым последствием раннего стрессирования животных является развитие отклонений в поведении по типу депрессивноподобных нарушений, повышенной тревожности и/или агрессивности, психотического состояния, а также возникновении когнитивных расстройств. По данным разных исследований, характер эмоционально-мотивационных нарушений у грызунов, подвергнутых стресс-воздействию, зависит от вида и линии животных, типа патогенного воздействия, длительности его действия, стадии онтогенеза, частоты хэндлинга [7—9]. Разработка разнообразных трансляционных моделей эмоционально-мотивационных расстройств является необходимым этапом изучения патофизиологических и молекулярно-генетических механизмов таких полиэтиологических нарушений.

К известным приемам индукции расстройств эмоционально-мотивационной сферы относится стрессирование путем изолированного содержания животных в течение нескольких недель, начиная с возраста отлучения от матери [7, 10—13]. Это патогенное воздействие сочетает в себе факторы, имеющие самостоятельное значение: изоляционный стресс и стресс в раннем периоде жизни (early-life stress), что приводит к нарушению формирования нервных цепей, обеспечивающих контроль над эмоциональными моторными реакциями со стороны лимбической системы и висцеральной коры, включающей инфраламбические и преламбические отделы медиальной префронтальной коры, а также кору островка [14]. Ранняя социальная изоляция по данным многих авторов приводит к развитию у животных гиперактивного фенотипа, повышенной агрессивности, изменений сенсомоторной реактивности, в частности, снижению предстиму-

льного торможения в акустическом стартл-рефлексе (признак развития психотического состояния), нарушению привыкания по показателю локомоций [7, 10, 15, 16]. В отношении повышенной тревожности и депрессивности данные противоречивы. Даже крысы одной линии Вистар, по одним данным, демонстрируют повышение тревожности в результате длительной социальной изоляции [15], а по другим данным [17], тревожность у них не изменяется. Есть свидетельства отсутствия статистически значимых изменений по показателю иммобильности в тесте форсированного плавания [15] и, напротив, о развитии «поведенческого отчаяния» в этом тесте без признаков агедонии (по показателям в тесте на потребление/предпочтение сахарозы) [12, 17]. Противоречивые данные об изменении когнитивной деятельности получены в тесте на пространственную память — в водном лабиринте Морриса [7, 18], однако в целом исследователи приходят к заключению о том, что социальная изоляция может изменять функционирование кортико-стриатных путей.

В настоящей работе мы предприняли попытку проанализировать последствия ранней социальной изоляции у крыс популяции Вистар по классическим поведенческим показателям для оценки психомоторной активности, тревожности и депрессивности, сопоставив их с изменениями сенсомоторной реактивности, а также когнитивной деятельности по показателю привыкания в акустическом стартл-рефлексе.

## Методика

Работа выполнена на 30 белых крысах популяции Вистар, выращенных в питомнике ФГБНУ «НИИОПП». В каждом из 6 пометов после рождения оставляли по 5 особей мужского пола для выравнивания условий развития. На 24-й постнатальный день животных отделяли от матери. В группу животных, подвергнутых социальной изоляции (изолянты), и в группу контроля было включено по 15 крысят (по 3 помета). Крыс-изолянтов во время всего обследования содержали в клетках размером 36,5 x 20,5 x 14,0 см поодиночке. Крыс контрольной группы содержали по 5 особей в клетках размером 37,0 x 57,0 x 19,0 см, сохраняя целостность помета. Животные находились в стандартных условиях вива-

рия с естественной сменой освещенности и свободным доступом к пище и воде во время обследования, за исключением четырех дней, во время которых проводили тест на предпочтение/потребление сахарозы (см. ниже). Все процедуры и эксперименты на животных проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г.

### **1. Оценка двигательной и исследовательской активности**

Использовали автоматизированный тест открытого поля с помощью оборудования системы «Orto-Vatimex» (Columbus Instruments, США). В условиях комнатной освещенности (42 лк) определяли длину пройденного пути в сантиметрах (горизонтальная активность) и число стоек (вертикальная активность) за 3 мин наблюдения.

### **2. Оценка тревожноподобного поведения**

#### **2.1. Приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ)**

Тревожность оценивали общепринятым методом в ПКЛ [19]. ПКЛ имеет четыре крестообразно расположенных рукава: два закрытых рукава (ЗР) с боковыми стенками и закрытым торцом (длина  $\times$  ширина  $\times$  высота: 43  $\times$  14  $\times$  22 см) и 2 открытых рукава (ОР), не имеющих стенок (длина  $\times$  ширина: 43  $\times$  14 см). ОР и ЗР расположены перпендикулярно друг другу. ПКЛ находился на высоте 70 см от пола. Центральная зона ПКЛ имеет размеры 14  $\times$  14 см. Освещенность над центральной зоной составляла 24 лк. Крысу помещали в центр ПКЛ мордой в сторону ОР. Для оценки поведения использовали автоматизированную видеосистему «Video-Mot2» (TSE System, Германия). В автоматическом режиме определяли следующие параметры: число заходов в ОР и ЗР, время, проведенное в ОР и ЗР, общее число заходов в рукава ПКЛ, предпочтение ОР как отношение числа заходов в ОР к общему числу заходов в рукава. Кроме того, определяли общий пробег животного и число стоек в ПКЛ. Длительность тестирования составляла 5 мин.

#### **2.2. Комплексная оценка тревожно-фобических состояний у крыс**

Использовали оригинальный метод [20], в основе которого лежит оценка выраженности поведенческих реакций у крыс по ранжированной шкале от нуля до трех баллов в батарее из 9 мягких стресс-тестов, провоцирующих видоспецифическое проявление тревожности и страха. По итогам обследования рассчитывается суммарная оценка выраженности тревожно-фобических реакций у крыс.

### **3. Оценка депрессивноподобного поведения**

#### **3.1. Тест принудительного плавания**

Оценку поведения проводили по методу Порсолта [21] в модификации, состоявшей в том, что крыс тестировали однократно. Ранее показано, что однократное тестирование подходит для выявления депрессивноподобного состояния [22] и является более информативным, чем повторное обследование через сутки [23]. В случае классического двухдневного теста претестирование оказывает депрессогенное действие, что может затруднять интерпретацию результатов у животных с уже индуцированным другими методами депрессивноподобным состоянием. Для тестирования крыс помещали в цилиндрический пластмассовый бак (высота 47 см, внутренний диаметр 35 см), заполненный водой на высоту 35 см, температура воды составляла 25—26 °С. Фиксировали число и длительность периодов активного плавания (энергичные движения всеми лапами с активным перемещением и/или попыткой выбраться), пассивного плавания (слабые гребки одной-двумя лапами, необходимые для поддержания тела на плаву) и иммобильности (отсутствие плавательных движений). Рассчитывали ритмологический индекс депрессивности (ИД), определяемый отношением числа самых коротких периодов иммобилизации (до 6 с) к общему числу периодов активного плавания [24]. С учетом того, что периоды иммобильности появляются, как правило, после пяти мин наблюдения, длительность тестирования составляла 10 мин.

#### **3.2. Оценка суточного потребления жидкости и предпочтения/потребления сахарозы**

На время тестирования крыс контрольной группы размещали индивидуально в клетках размером 36,5  $\times$  20,5  $\times$  14,0 см (такого же размера, как и клетки, в которых содержали крыс-изолянтов). В течение 5 дней крысам каждой группы предоставляли только сухой корм. В каждой клетке находились две поилки: одна с водопроводной водой, другая — с 10%-раствором сахарозы, которые каждый день меняли местами. После двухдневной адаптации ежедневно с 10.00 до 12.00 в течение 3 суток измеряли суммарное потребление жидкости (сахароза + вода, г) и определяли предпочтение сахарозы воде (в процентах от общего количества выпитой жидкости). Кроме того, рассчитывали относительное потребление сахарозы в процентах от массы тела по формуле: (выпитая сахароза, г)/(масса тела, г)  $\times$  100. На основании снижения суточного потребления жидкости судили об уровне питьевой мотивации; на основании снижения относительного потребления и предпочтения сахарозы судили о развитии гедонических нарушений, как симптома депрессивноподобного состояния [25]. Для окончательных оценок на

каждом сроке обследования использовали усредненные по трем измерениям показатели.

#### 4. Оценка агрессивности

Зоосоциальное взаимодействие оценивали в незнакомой для крыс клетке из плексиглаза (37,0 x 57,0 x 19,0 см) в экспериментальной комнате при красном свете: освещенность над центром клетки составляла 7 лк. Оценивали поведение в парах крыс, входящих в одну группу — опытную или контрольную. Животные в парах не были знакомы друг с другом, так как были выбраны из разных пометов. Различие в весе было не более 10—15%. Перед тестированием крыс в течение двух дней содержали в клетках индивидуально. В течение 15 мин оценивали частоту и длительность активных неагрессивных и агрессивных социальных контактов. К активным неагрессивным социальным контактам относили вынюхивание, социальный груминг, залезание под или налезание на партнера, преследование, не заканчивавшееся проявлением агрессии.

К агрессивным контактам относили преследование, переходящее в агрессивное взаимодействие, атаки/драки, укусы, агрессивный груминг. Для характеристики поведения крыс в тесте зоосоциального взаимодействия использовали показатели латентности, суммарного числа и времени активных неагрессивных и агрессивных контактов.

Крыс тестировали в возрасте одного (до изоляции), двух (4 недели социальной изоляции) и трех (8 недель социальной изоляции) мес, за исключением оценки тревожно-фобического уровня, которую проводили только в возрасте одного и двух мес. На каждом сроке обследования порядок проведения тестов в каждой группе был одним и тем же: определение потребления жидкости и предпочтения/потребления сахарозы (5 дней), тест зоосоциального взаимодействия (на 3-й день одиночного содержания в клетках во время тестирования потребления жидкости и предпочтения/потребления сахарозы), 3 дня без тестирования, оценка двигательной и исследовательской активности (1 день), оценка тревожно-фобического уровня (1 день), ПКЛ (1 день), тест принудительного плавания (1 день). Общая длительность обследования каждой группы составляла 12 дней.

#### 5. Оценка привыкания и сенсомоторной реактивности по показателям акустического стартл-рефлекса

В работе применяли модульную установку «Coulbourn Instruments» (США), сконструированную для анализа акустического стартл-ответа (АСО) одновременно у двух крыс. Животных помещали в специальные держатели — пеналы (8 x 15 см) с решетчатым верхом, которые ставили на чувствительные

к колебаниям отградуированные для величины ответа до 400 г платформы со встроенными пьезоэлектрическими акселерометрами. Платформы находились в свето- и звукоизолированной вентилируемой камере. Звуковые сигналы подавали через громкоговоритель, вмонтированный в пол камеры. Тестирование проводили на фоне белого шума (70 дБ) (генератор белого шума WNG 023, Россия), интенсивность которого контролировали с помощью шумомера 8922 («AZ Instruments», Тайвань). Амплитуду АСО (пик реакции вздрагивания) определяли на микроЭВМ IBM PC/AT по максимальному напряжению, пропорциональному скорости смещения пьезоэлектрического акселерометра платформы, в течение 200-мс интервала с момента подачи сигнала и выражали в условных граммах стартл-реакции (усл. г). По результатам наших предыдущих исследований латентность АСО может изменяться при нарушениях психоэмоционального состояния [26], поэтому данный показатель, определяемый как время достижения пика реакции вздрагивания (мс), был включен в анализ. Оценку характеристик АСО и кратковременного привыкания (негативного обучения) проводили в одной экспериментальной сессии по специальной программе, включавшей последовательно 121 сигнал для оценки привыкания, и далее, без дополнительного перерыва, 40 сигналов для оценки сенсомоторной реактивности, в соответствии с методическими рекомендациями [27].

##### 5.1. Оценка привыкания

Крысам после пятиминутного адаптационного периода предъявляли серию из акустических сигналов в виде 121 вспышки белого шума с уровнем звука 120 дБ (сверхпороговая величина раздражителя), длительностью 20 мс каждая, с крутизной нарастания, равной 2 мс. Интервал между сигналами был фиксированным и составлял 10 с. Общая длительность этой части сессии составляла 25,2 мин. Время принудительной вентиляции камеры после каждой попытки составляло 5 с. Для анализа данных ответы группировали в 12 блоков по 10 ответов в каждом.

Ответ на первый сигнал не учитывали из-за его большой индивидуальной вариабельности. Для каждого животного рассчитывали среднюю величину амплитуды АСО на 120 предъявленных сигналов  $A_{cp-120}$  и среднюю величину латентности  $Lat_{cp-120}$ , затем рассчитывали  $A_{cp}$  и  $Lat_{cp}$  по блокам в каждой группе.

Привыкание крыс к действию раздражителя в течение сессии оценивали по динамике снижения  $A_{cp}$  от 1-го блока к последнему. Использовали оценки изменения абсолютной величины амплитуды АСО и ее относительного снижения в динамике обследования.

Снижение амплитуды АСО рассчитывали как отношение величины  $A_{cp}$  в каждом последующем блоке к величине  $A_{cp}$  в первом блоке, в процентах. Из полученного значения величины амплитуды в блоке (в %) вычитали величину амплитуды в первом блоке, принятую за 100%, разница служила характеристикой привыкания:

$$[A_{cp}(\text{блок}_n) / A_{cp}(\text{блок}_1) * 100\%] - 100\%,$$

где  $n$  — номер блока.

В соответствии с данной формулой 0% означает отсутствие различий между  $A_1$  и  $A_n$ , то есть отсутствие привыкания; отрицательные значения характеризуют выраженность относительного снижения АСО со временем, то есть выраженность привыкания, положительные значения или отсутствие статистически значимого относительного снижения амплитуды АСО свидетельствуют о выраженном срыве привыкания. Относительное изменение латентности АСО в процессе тестирования рассчитывали аналогично. Из анализа были исключены данные тех животных, у которых амплитуда АСО была очень низкой: критерий исключения —  $A_{cp}$  в блоке 1 меньше или равна 25,0 усл.г; так как в диапазоне АСО 1,0—25,0 усл.г не выполнялось требование линейности калибровки.

## 5.2. Оценка сенсомоторной реактивности

Основными характеристиками сенсомоторной реактивности в акустическом стартл-рефлексе (реакция вздрагивания) являются амплитуда ответа ( $A$ ) на сильный сверхпороговый раздражитель, и так называемое предстимульное торможение (ПСТ), отражающее величину снижения ответной реакции в случае, если сильному раздражителю предшествует подпороговый сигнал той же или иной модальности. Принято считать, что  $A$  характеризует эффективность передачи сигнала в нервной цепи рефлекса, а ПСТ — эффективность сенсомоторного входа, фильтрации сигнала [27]. В настоящей работе оценивали АСО на 40 сигналов четырех типов: основной сверхпороговый стимул (120 дБ), и 3 комбинации предстимулов подпороговой величины, не достаточной для вызова реакции вздрагивания (73, 75 и 80 дБ), с последующим

основным стимулом. О величине ответа на основной сигнал судили по амплитуде  $A_{осн}$ , на комбинированные сигналы — по амплитуде  $A_x$ , где  $x$  — интенсивность предстимульного сигнала. Интервал между предстимулом и стимулом составлял 100 мс, интервалы между попытками были рандомизированы и составляли в среднем 15 с (от 10 до 20 с). Время принудительной вентиляции камеры после каждой попытки составляло 7 с. Каждый тип сигнала предъявляли по 10 раз в случайном порядке таким образом, чтобы не было двух одинаковых следующих друг за другом сигналов. Длительность этой части сессии составляла 16 мин.

Величину АСО на основной сигнал принимали за 100%. Предстимульное торможение (ПСТ) АСО, рассчитывали следующим образом:

$$\text{ПСТ}\% = 100\% - A_x/A_{осн} * 100\%.$$

Для каждого животного и затем для группы рассчитывали ПСТ по всем попыткам одного типа. Затем рассчитывали средние величины ПСТ<sub>ср</sub> по трем типам сигналов с предстимулом.

После тестирования из анализа были исключены данные тех животных, у которых величина показателей не соответствовала эмпирическим критериям: 1)  $A_{осн}$  была меньше 25 или больше 400 усл.г, так как в этих диапазонах не выполнялось требование линейности калибровки. Тестирование проводили однократно у крысят в возрасте полных 3 мес через неделю после окончания поведенческого обследования, что соответствовало примерно 9 неделям социальной изоляции.

## 6. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку данных проводили по алгоритмам программы «STATISTICA For Windows 7.0». По результатам предварительной проверки гипотезы о нормальном характере распределения данных по тестам Колмогорова—Смирнова и Лиллиефорса в случае, если гипотезу не отклоняли, применяли параметрические методы анализа, если гипотезу отклоняли — непараметрические методы. В работе использовали параметрический однофакторный дисперсионный анализ One Way ANOVA, параметрический дисперсионный анализ для повтор-

Таблица 1

Вес крыс в динамике обследования

Группа	Вес крыс (г) в возрасте:		
	1 мес.	2 мес.	3 мес.
Контроль (n = 15)	92,1 ± 1,9	224,5 ± 2,8	320,5 ± 5,0
Социальная изоляция (n = 15)	96,3 ± 2,2	229,3 ± 6,7	326,3 ± 6,7

Примечание.  $n$  — число животных в группе.



ных измерений Repeated Measures ANOVA, непараметрический критерий Манна—Уитни для независимых переменных (обработка результатов в тесте принудительного плавания и в тесте зоосоциального взаимодействия). Принятый уровень значимости составлял 5%. Данные представлены в виде  $M \pm S.E.M.$

### Результаты и обсуждение

На протяжении всего обследования вес крыс-изолянтов не отличался от веса животных в контрольной группе (табл. 1).

#### Оценка двигательной и исследовательской активности

В возрасте 1 и 2 мес. крысы-изолянты не отличались от контроля по двигательной и исследовательской активности в тестах автоматизированного «открытого поля» и ПКЛ (табл. 2), однако в возрасте 3 мес. крысы, подвергнутые 8-недельной социальной изоляции, демонстрировали выраженную тенденцию к увеличению общего пробега в ПКЛ по сравнению с контролем ( $F = 4,073$ ;  $p = 0,053$ ; One Way ANOVA) наряду с выраженной тенденцией к увеличению скорости перемещения: у крыс-изолянтов скорость движения составляла  $5,5 \pm 0,5$  см/с, а в контроле —  $4,2 \pm 0,4$  см/с ( $F = 4,078$ ;  $p = 0,053$ ; One Way ANOVA).

#### Оценка тревожноподобного поведения

В тесте ПКЛ крысы-изолянты ни на одном из сроков обследования не отличались статистически значимо от контрольных крыс ни по одному из специфических показателей тревожности (табл. 3). По тревожно-фобическому уровню крысы, подвергну-

тые социальной изоляции, также не отличались от контроля.

#### Оценка депрессивноподобного поведения

В тесте принудительного плавания подопытные крысы не отличались от контроля по основным показателям на всех сроках обследования (табл. 4), однако через 4 недели социальной изоляции латентный период иммобильности у них был более чем на 2 мин меньше, чем в контроле.

В тесте потребления жидкости и предпочтения/потребления сахарозы сразу после отделения от матери (1 мес.) и в возрасте 2 мес. крысы-изолянты не отличались от контроля ни по одному из показателей (табл. 5). Однако через 8 недель изоляции у крыс опытной группы выявлено статистически значимое увеличение потребления жидкости на фоне выраженной тенденции к увеличению абсолютного и относительного потребления сахарозы.

#### Оценка агрессивности

Число и время активных неагрессивных социальных контактов у крыс опытной группы сразу после отделения от матери (возраст 1 мес.) и через 4 недели социальной изоляции (возраст 2 мес.) не отличались от контрольных значений (рис. 1), однако через 8 недель социальной изоляции (возраст 3 мес.) было выявлено статистически значимое увеличение времени таких контактов и обнаружена выраженная тенденция ( $p = 0,097$  по критерию Манна—Уитни) к увеличению их числа.

Сразу после отделения от матери крысы опытной группы не отличались от контроля по числу и длительности агрессивных социальных контактов (рис. 1). Социальная изоляция в течение 4 недель приводила к статистически значимому увеличению

Таблица 2

Двигательная (пройденный путь, см) и исследовательская (вертикальные стойки, число) активность у крыс, подвергнутых социальной изоляции, и контрольных животных в возрасте 1, 2 и 3 мес. в тесте автоматизированного «открытого поля» и в приподнятом крестообразном лабиринте

Группы	Автоматизированное "открытое поле"					
	1 мес.		2 мес.		3 мес.	
	Пройденный путь	Стойки	Пройденный путь	Стойки	Пройденный путь	Стойки
Контроль	206,6 ± 28,1	20,6 ± 1,4	951,2 ± 62,8	17,1 ± 1,1	866,3 ± 75,7	13,9 ± 1,2
Социальная изоляция	190,8 ± 34,6	17,6 ± 1,6	897,5 ± 71,1	16,5 ± 1,6	861,8 ± 43,8	13,8 ± 0,9
Группы	Приподнятый крестообразный лабиринт					
	Пройденный путь	Стойки	Пройденный путь	Стойки	Пройденный путь	Стойки
	Пройденный путь	Стойки	Пройденный путь	Стойки	Пройденный путь	Стойки
Контроль	2028,3 ± 138,5	16,3 ± 1,2	1638,5 ± 153,7	10,4 ± 1,5	1259,1 ± 126,6	8,7 ± 1,1
Социальная изоляция	2189,8 ± 120,1	14,9 ± 1,9	1891,3 ± 172,0	10,2 ± 1,4	1654,3 ± 149,4 #	10,1 ± 1,0

Примечание. #  $p < 0,06$  по сравнению с соответствующим контрольным значением (по One Way ANOVA).

числа и длительности агрессивных контактов. Эффект сохранялся после 8 недель социальной изоляции.

#### Оценка привыкания и сенсомоторной реактивности в акустическом старт-рефлексе

При внутригрупповом сравнении анализ привыкания в динамике обследования выявил снижение абсолютной величины амплитуды АСО как в группе крыс, подвергнутых социальной изоляции [ $F(11, 143) = 2,749$ ;  $p = 0,003$ , Repeated Measures ANOVA], так и в контрольной группе крыс [ $F(11, 121) = 5,544$ ;  $p < 0,001$ ]. Относительное снижение  $A_{cp}$  в группе крыс-изолянтов не было статистически значимым [ $F(10, 130) = 1,1382$ ;  $p = 0,339$ ; сравнение со значением показателя в блоке 2, так как в блоке 1 изменение всегда составляло 0%]. Однако контрольные крысы демонстрировали выраженную тенденцию к относительному снижению амплитуды АСО:  $F(10, 110) = 1,776$ ;  $p = 0,073$ .

При межгрупповом сравнении крысы-изолянты не отличались от контроля по абсолютной величине  $A_{cp}$  в первом блоке (усреднение 10 первых ответов в сес-

сии по оценке привыкания): соответственно  $192,3 \pm 63,4$  усл.г и  $246,9 \pm 67,9$  усл.г.;  $p = 0,563$  (One Way ANOVA). Однако относительное снижение  $A_{cp}$  в блоках 4, 7 и 12 в группе крыс, подвергнутых социальной изоляции, было статистически значимо меньше, чем в контроле (рис. 2А). В блоке 12 у контрольных крыс относительное снижение АСО составило  $50,4 \pm 5,3\%$ , тогда как у крыс-изолянтов его практически не было. Выявленная тенденция к меньшему снижению амплитуды у крыс-изолянтов отмечена в блоках 2, 3, 8 и 10.

Ни в одной из групп при внутригрупповых сравнениях не выявлено изменения абсолютной величины латентности АСО и ее относительного изменения в динамике обследования. При межгрупповом сравнении также не обнаружено различий в средних значениях абсолютной величины латентности АСО и ее относительного изменения в блоках.

По основным показателям сенсомоторной реактивности — амплитуде АСО и ПСТ при всех интенсивностях предстимула — крысы, подвергнутые социальной изоляции, не отличались от контрольных

Таблица 3

Показатели тревожности у крыс-изолянтов и контрольных животных в возрасте 1, 2 и 3 мес. в придонном крестообразном лабиринте и по результатам обследования комплексным методом оценки тревожно-фобического уровня

Показатели	Группы	
	Контроль	Социальная изоляция
1 мес.		
Время в ОР, мс	$27069,2 \pm 6842,6$	$18760,7 \pm 4552,1$
Число заходов в ОР	$3,6 \pm 0,8$	$1,9 \pm 0,5$
Предпочтение ОР, %	$23,1 \pm 4,5$	$13,6 \pm 2,5$
Время в ЗР, мс	$198929,9 \pm 12850,4$	$217178,9 \pm 7164,7$
Число заходов в ЗР	$9,8 \pm 0,8$	$11,0 \pm 1,2$
Общий балл тревожности	$7,3 \pm 1,0$	$8,0 \pm 0,7$
2 мес.		
Время в ОР, мс	$8701,6 \pm 2323,4$	$14014,1 \pm 3675,7$
Число заходов в ОР	$1,5 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,4$
Предпочтение ОР, %	$20,0 \pm 3,8$	$24,6 \pm 4,5$
Время в ЗР, мс	$259688,9 \pm 7806,7$	$242992,1 \pm 9739,3$
Число заходов в ЗР	$5,5 \pm 0,9$	$6,5 \pm 1,2$
Общий балл тревожности	$5,7 \pm 0,8$	$6,1 \pm 0,7$
3 мес.		
Время в ОР, мс	$11256,1 \pm 4211,2$	$19110,8 \pm 5106,1$
Число заходов в ОР	$1,5 \pm 0,4$	$2,3 \pm 0,6$
Предпочтение ОР, %	$14,5 \pm 3,7$	$16,5 \pm 3,8$
Время в ЗР, мс	$238562,5 \pm 12422,5$	$217288,6 \pm 14697,4$
Число заходов в ЗР	$6,2 \pm 0,8$	$7,9 \pm 1,0$
Общий балл тревожности	Не оценивали	Не оценивали

животных. Амплитуда АСО у крыс-изолянтов в ответ на 10 сверхпороговых стимулов, предъявленных в случайном порядке (см. методику), составила  $104,8 \pm 21,2$  усл.г, а в контроле —  $104,7 \pm 21,9$  усл. г. Величина ПСТ при разных интенсивностях предстимульного сигнала представлена на рис. 2 Б.

Выявленные изменения в поведении крыс-изолянтов следует рассматривать как результат экспериментальной социальной изоляции, так как сразу после отлучения от матери (возраст 1 мес.) различий между крысами опытной и контрольной групп ни по одному из показателей не было обнаружено.

В настоящем исследовании получены экспериментальные свидетельства стойкого влияния социальной изоляции на характер зоосоциального взаимодействия крыс. Уже через 4 недели социальной изоляции мы наблюдали усиление агрессивного поведения, сохра-

нявшееся при увеличении длительности изоляции до 2 мес., что хорошо согласуется с данными других исследователей [7, 10, 15]. Помимо этого, восьминедельная изоляция приводила также к увеличению времени активного неагрессивного взаимодействия животных, которое проходило при красном свете в незнакомой клетке. Интересно, что усиление активного социального взаимодействия у крыс-изолянтов описано ранее в условиях тестирования при яркой освещенности в незнакомой клетке, но не при красном свете в знакомой клетке [10]. Сопоставляя данные этого исследования с данными настоящей работы, можно предположить, что ключевым условием усиления активного социального взаимодействия у крыс-изолянтов может быть незнакомая обстановка, а не освещенность. Такому предположению противоречит тот факт, что у крыс, подвергнутых социальной изоляции в течение 4 недель, не наблюдали

Таблица 4

Показатели плавательного поведения у крыс-изолянтов и контрольных животных в возрасте 1, 2 и 3 мес. в тесте принудительного плавания

Показатели	Группы	
	Контроль	Социальная изоляция
1 мес.		
Длительность активного плавания, с	$218,8 \pm 21,7$	$175,0 \pm 17,3$
Длительность пассивного плавания, с	$380,2 \pm 21,4$	$418,5 \pm 17,5$
Длительность иммобильности, с	$1,0 \pm 0,6$	$6,5 \pm 2,5$
Латентный период иммобильности, с	$426,7 \pm 68,7$	$305,2 \pm 46,1$
Число периодов активного плавания	$11,2 \pm 1,6$	$10,7 \pm 1,1$
Число периодов иммобильности длительностью до 6 с	$0,8 \pm 0,4$	$3,7 \pm 1,3$
Индекс депрессивности	$0,1 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,2$
2 мес.		
Длительность активного плавания, с	$139,4 \pm 21,4$	$116,7 \pm 13,9$
Длительность пассивного плавания, с	$443,8 \pm 20,9$	$478,5 \pm 14,1$
Длительность иммобильности, с	$10,6 \pm 4,2$	$6,6 \pm 2,4$
Латентный период иммобильности, с	$346,8 \pm 44,6$	$211,0 \pm 22,4^*$
Число периодов активного плавания	$8,0 \pm 1,2$	$7,3 \pm 0,5$
Число периодов иммобильности длительностью до 6 с	$3,3 \pm 0,7$	$3,9 \pm 1,3$
Индекс депрессивности	$0,5 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,2$
3 мес.		
Длительность активного плавания, с	$102,3 \pm 17,4$	$68,9 \pm 8,9$
Длительность пассивного плавания, с	$491,0 \pm 17,8$	$527,6 \pm 9,5$
Длительность иммобильности, с	$6,7 \pm 2,4$	$3,5 \pm 2,0$
Латентный период иммобильности, с	$304,1 \pm 46,0$	$341,8 \pm 73,6$
Число периодов активного плавания	$6,9 \pm 0,8$	$5,9 \pm 0,6$
Число периодов иммобильности длительностью до 6 с	$2,4 \pm 0,8$	$1,5 \pm 0,7$
Индекс депрессивности	$0,4 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,1$

Примечание. \*  $p = 0,028$  по сравнению с соответствующим контрольным значением (по U-критерию Манна–Уитни).

усиления активного неагрессивного социального взаимодействия, хотя тестирование проводили в той же обстановке и по той же схеме. В этой связи более вероятным представляется объяснение, связывающее усиление активного социального взаимодействия у крыс после 8 недель изоляции с небольшой гиперактивностью, выявленной у животных в этот период в стрессогенной обстановке ПКЛ.

В нашей работе было обнаружено абсолютное и относительное усиление потребления сахарозы (на уровне выраженной тенденции) крысами-изолянтами на фоне отсутствия различий в весе с контрольными животными, что также согласуется с данными других исследователей [7, 11, 17] и укладывается в представления об увеличении чувствительности к положительному подкреплению у социально изолированных особей.

В литературе описан такой эффект социальной изоляции, как гиперреактивность в новой обстановке [7, 12, 28, 29]. В настоящей работе получены свидетельства гиперактивности социально изолированных крыс по усилению величины и скорости пробега в стрессогенной обстановке 5-минутного обследования в ПКЛ (на уровне тенденции), но не в условиях 3-минутного обследования в автоматизированном

«открытом поле» при мягкой освещенности в небольшом открытом пространстве. Ни в том, ни в другом тесте нами не было получено данных об усилении исследовательской активности. В работе Йилдирима [17] при 5-минутном обследовании в автоматизированном «открытом поле» крыс после 7-недельной социальной изоляции также не было получено данных, подтверждающих наличие у животных гиперреактивности. При более длительном обследовании в данном тесте (30 мин) удалось выявить локомоторную гиперреактивность у крыс, подвергавшихся 12-недельной социальной изоляции [29], но у крыс, подвергавшихся 8-недельной изоляции, даже при 60-минутном тестировании не было обнаружено увеличения двигательной активности [16], хотя они демонстрировали активацию исследовательской деятельности (по числу обследованных «дырочек» и вертикальных стоек). По-видимому, длительность стрессирующего воздействия окружающей среды и время тестирования нужно учитывать при анализе эффектов социальной изоляции на поведение.

В настоящей работе нам впервые удалось обнаружить нарушение кратковременного привыкания (в течение одной сессии) в акустическом стартл-рефлексе у крыс, подвергнутых двухмесячной социальной изоля-

Таблица 5

Потребление жидкости и предпочтение/потребление сахарозы у крыс-изолянтов и контрольных животных в возрасте 1, 2 и 3 мес.

Показатели	Группы	
	Контроль	Социальная изоляция
1 мес.		
Суточное потребление жидкости	22,7 ± 1,0	24,0 ± 2,1
Суточное потребление воды	9,7 ± 1,5	10,6 ± 1,5
Суточное потребление сахарозы	12,9 ± 1,8	13,4 ± 1,8
Предпочтение сахарозы	55,7 ± 6,7	54,0 ± 5,5
Относительное потребление сахарозы	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
2 мес.		
Суточное потребление жидкости	42,7 ± 2,1	44,8 ± 2,8
Суточное потребление воды	7,0 ± 1,7	9,7 ± 1,8
Суточное потребление сахарозы	35,7 ± 3,2	35,1 ± 3,4
Предпочтение сахарозы	81,7 ± 4,9	76,2 ± 4,8
Относительное потребление сахарозы	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
3 мес.		
Суточное потребление жидкости	50,4 ± 2,2	63,8 ± 6,1 *
Суточное потребление воды	4,7 ± 1,1	5,4 ± 1,5
Суточное потребление сахарозы	45,8 ± 1,9	58,3 ± 6,6 #
Предпочтение сахарозы	91,1 ± 1,9	88,2 ± 3,9
Относительное потребление сахарозы	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0 #

Примечание. \*  $p = 0,048$  по сравнению с соответствующим контрольным значением; #  $p \leq 0,08$  (по One Way ANOVA).

дии, что расширяет спектр экспериментальных свидетельств развития дефицита неассоциативного обучения, то есть, наличия когнитивных нарушений у крыс-изолянтов. Ранее ухудшение привыкания у таких животных было продемонстрировано по другому показателю — при одночасовом тестировании двигательной активности в автоматизированном «открытом поле» [30]. В акустическом стартл-рефлексе ранее не было обнаружено нарушения кратковременного привыкания у крыс, в течение 8 недель после отлучения от матери находившихся в условиях социальной изоляции [16]. Однако помимо того, что указанное исследование проведено на крысах другой линии (Sprague-Dawley), надо иметь в виду, что авторы применяли иной подход для оценки привыкания: о нем судили не по снижению амплитуды АСО в ответ на предъявление большого числа одинаковых стимулов, а по расчету отношения  $A_{cp}$  в блоке из 6 первых после-

довательных ответов на сверхпороговый сигнал к  $A_{cp}$  в блоке из 6 заключительных ответов на такой же сигнал в сессии по оценке ПСТ.

В нашей работе, в отличие от целого ряда исследований [7, 16, 29, 30], мы не обнаружили статистически значимых признаков развития психотического состояния у крыс-изолянтов, хотя снижение величины ПСТ был заметно при всех интенсивностях предстимула (рис. 2, Б), модулирующего АСО на сверхпороговый раздражитель. В большинстве перечисленных работ использовали крыс других линий, не Вистар, что само по себе может быть причиной выявленного несогласования данных [27], однако исследование Домини и соавторов [29] проведено на крысах линии Вистар. Для возможного объяснения полученных расхождений можно привлечь представления о том, что резу-

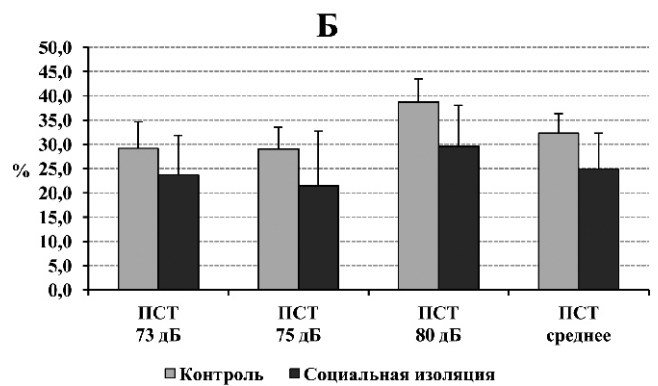
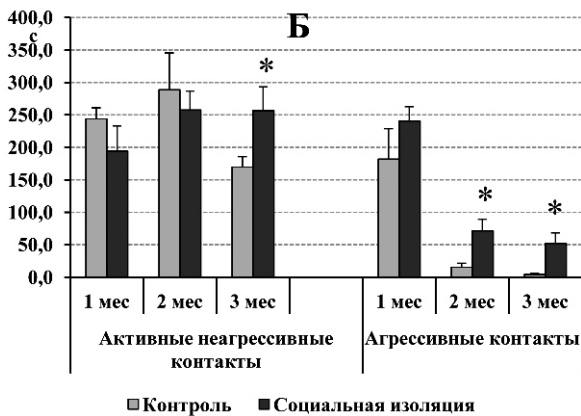
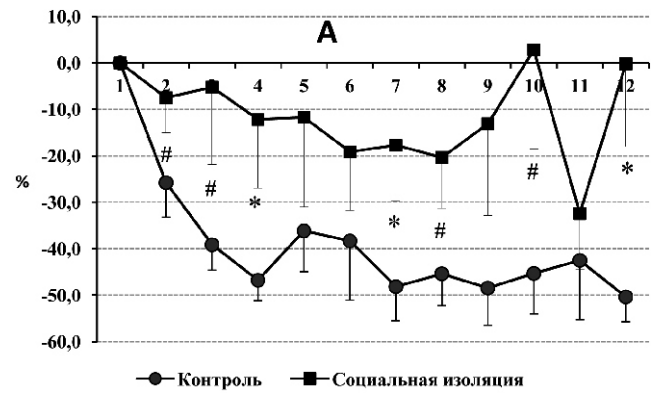
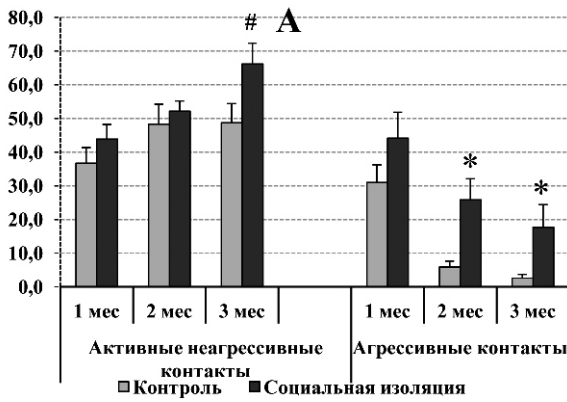


Рис. 1. Число (А) и время (Б) социальных контактов в тесте зоосоциального взаимодействия у крыс, подвергнутых социальной изоляции, в сравнении с контрольными животными. По вертикальной оси: А — число социальных контактов; Б — длительность социальных контактов (с). По горизонтальной оси — возраст крыс при обследовании: 1 мес. — сразу после отлучения от матери; 2 мес. — для крыс опытной группы соответствует 4 неделям социальной изоляции; 3 мес — для крыс опытной группы соответствует 8 неделям социальной изоляции. \*  $p < 0,05$ ; #  $p < 0,1$  по сравнению с соответствующим показателем в контроле (непараметрический критерий Манна—Уитни).

Рис. 2. Динамика привыкания (А) и предстимульное торможение (Б) в акустическом стартл-рефлексе у крыс, подвергнутых социальной изоляции (9 недель), в сравнении с контрольными животными. По оси ординат: А — изменение амплитуды АСО относительно блока 1, %; Б — предстимульное торможение (ПСТ), %. По оси абсцисс: А — номера блоков; Б — ПСТ при разной интенсивности предстимульного сигнала и среднее значение ПСТ. \*  $p < 0,05$ ; #  $0,06 < p < 0,1$  по сравнению с соответствующим значением в группе «Контроль» (однофакторный дисперсионный анализ One Way ANOVA).

льтаты измерения ПСТ зависят от многих методологических характеристик [27]. Кроме того, в работе Домини и соавторов [29] установлено, что величина ПСТ при повторных измерениях даже в условиях длительной 12-недельной социальной изоляции зависит от того, подвергают ли крысу поведенческому тестированию по другим показателям как до, так и после измерения ПСТ. Такое тестирование может приводить к исчезновению эффекта дефицита ПСТ у крыс-изолянтов. В нашем исследовании ПСТ изучали в объединенной сессии по оценке привыкания и ПСТ, как рекомендовано в методической работе [27]. Не исключено, что использованный подход мог повлиять на окончательную оценку величины ПСТ. Однако, в согласии с данными других исследований, мы не обнаружили увеличения амплитуды АСО у крыс-изолянтов [7, 16, 29, 30].

В настоящей работе нам не удалось получить свидетельств повышения уровня тревожности и депрессивноподобного поведения у крыс-изолянтов, что совпадает с результатами ряда исследователей [7, 15, 17]. Отсутствие признаков повышения тревожности и депрессивности в специализированных поведенческих тестах находит косвенное подтверждение в тесте зоосоциального взаимодействия: крысы-изолянты демонстрировали не снижение, а повышение длительности активного неагрессивного взаимодействия наряду с усилением агрессивности. Стоит, однако, отметить, что четырехнедельная социальная изоляция привела к снижению латентного периода появления иммобильности в тесте принудительного плавания. Этот показатель не является специфическим для характеристики депрессивноподобного поведения и имеет ценность в совокупности с другими изменениями плавательного поведения. Отсутствие изменений в характеристиках плавательного поведения в условиях аверсивной неизбежной ситуации, по мнению многих исследователей, свидетельствует о том, что длительная социальная изоляция не изменяет способности крыс преодолевать кратковременный сильный стресс [7], а снижение латентности иммобильности на одном из этапов социальной изоляции может отражать апробацию новой стратегии преодоления.

В целом, данные настоящего исследования позволяют использовать крыс Вистар, подвергнутых длительной социальной изоляции, как модель повышенной агрессивности с признаками когнитивного дефицита по показателям неассоциативного обучения в акустическом стартл-рефлексе, удобную для сравнительных патофизиологических исследований.

Работа поддержана грантом Российского Фонда Фундаментальных исследований № 15-04-08784.

## References

1. Gapp K., von Ziegler L., Tweedie-Cullen R.Y., Mansuy I.M. Early life epigenetic programming and transmission of stress-induced traits in mammals. *Bioessays*. 2014; 36(5): 491-502. doi: 10.1002/bies.201300116.
2. Schmitt A., Malchow B., Hasan A., Falkai P. The impact of nvironmental factors in severe psychiatric disorders. *Front. Neurosci*. 2014; Vol. 8. Article 19. doi: 10.3389/fnins.2014.00019
3. Walker A.J., Kim Y., Price J.B., Kale R.P., McGillivray J.A., Berk M., Tye S.J. Stress, inflammation, and cellular vulnerability during early stages of affective disorders: biomarker strategies and opportunities for prevention and intervention. *Front. Psychiatry*. 2014; Vol. 5. Article 34. doi: 10.3389/fpsyt.2014.00034
4. Idowa G.V., Alperina E.L., Gevorgyan M.M., Zhukova E.N. Psychoneuroimmunomodulation. Aggression and immunity. *Patogenez*. 2014; 12(3): 27-32. (In Russian)
5. Heim C., Plotsky P.M., Nemeroff C.B. Importance of studying the contributions of early adverse experience to neurobiological findings in depression. *Neuropsychopharmacol*. 2004; 29(4): 641-8.
6. Cassano P., Hidalgo A., Burgos V., Adris S., Argibay P. Hippocampal upregulation of the cyclooxygenase-2 gene following neonatal clomipramine treatment (a model of depression). *Pharmacogenomics J*. 2006; 6(6): 381-7. Epub 2006 Mar 28.
7. Fone K.C., Porkess M.V. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev*. 2008; 32: 1087-102.
8. Grippo A.J., Wu K.D., Hassan I., Carter C.S. Social isolation in prairie voles induces behaviors relevant to negative affect: toward the development of a rodent model focused on co-occurring depression and anxiety. *Depress. Anxiety*. 2008; 25(6): E17-E26. doi:10.1002/da.20375.
9. Lupien S.J., McEwen B.S., Gunnar M.R., Heim C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat. Rev. Neurosci*. 2009; 10(6): 434-45. doi: 10.1038/nrn2639.
10. Wongwitdecha N., Marsden C.A. Social isolation increases aggressive behaviour and alters the effects of diazepam in the rat social interaction test. *Behav. Brain Res*. 1996a; 75(1-2): 27-32.
11. Brenes J.C., Fornaguera J. Effects of environmental enrichment and social isolation on sucrose consumption and preference: associations with depressive-like behavior and ventral striatum dopamine. *Neurosci. Lett*. 2008; 436: 278-82.
12. Brenes J.C., Fornaguera J. The effect of chronic fluoxetine on social isolation-induced changes on sucrose consumption, immobility behavior, and on serotonin and dopamine function in hippocampus and ventral striatum. *Behav. Brain Res*. 2009; 165: 187-96.
13. Ago Y., Takuma K., Matsuda T. The potential role of serotonin1A receptors in post-weaning social isolation-induced abnormal behaviors in rodents. *J. Pharmacol. Sci*. 2014; 125: 237-41.
14. Card JP, Levitt P, Gluhovsky M, Rinaman L. Early experience modifies the postnatal assembly of autonomic emotional motor circuits in rats. *J. Neurosci*. 2005; 25: 9102-11.
15. Karim A., Arslan M.I. Isolation modifies the behavioural response in rats. *Bangladesh Med. Res. Counc. Bull*. 2000; 26(1): 27-32.

16. Varty G.B., Paulus M.P., Braff D.L., Geyer M.A. Environmental enrichment and isolation rearing in the rat: effects on locomotor behavior and startle response plasticity. *Biol. Psychiatry*. 2000; 47: 864-73.
17. Yildirim E., Erol K., Ulupinar E. Effects of sertraline on behavioral alterations caused by environmental enrichment and social isolation. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2012; 101(2): 278-87. doi: 10.1016/j.pbb.2011.12.017.
18. Wongwitdecha N., Marsden C.A. Effects of social isolation rearing on learning in the Morris water maze. *Brain Res.* 1996b; 715(1-2): 119-24.
19. Walf A.A., Frye Ch.A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat. Protoc.* 2007; 2: 322-8.
20. Rodina V.I., Krupina N.A., Kryzhanovskii G.N., Oknina N.B. A multiparameter method for the complex evaluation of anxiety-phobic states in rats. *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I.P. Pavlova.* 1993; 43(5): 1006-17. (In Russian)
21. Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., Jalfre M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Europ. J. Pharmacol.* 1978; 47(2): 379-91.
22. Pucilowski O., Overstreet D.H. Effect of chronic antidepressant treatment on responses to apomorphine in selectively bred rat strains. *Brain Res Bull.* 1993; 32(5):471-5.
23. Kryzhanovskii G.N., Krupina N.A., Kucherianu V.G. A new model of an experimental depressive syndrome in rats induced by the systemic administration to the animals of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I.P. Pavlova.* 1995; 45(2): 377-87. (In Russian)
24. Shchetinin E.V., Baturin V.A., Arushanian E.B., Ovanesov K.B., Popov A.V. A biorhythmologic approach to evaluating forced swimming as an experimental model of a «depressive» state. *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I.P. Pavlova.* 1989; 39(5): 958-64. (In Russian)
25. D'Aquila P.S., Newton J., Willner P. Diurnal variation in the effect of chronic mild stress on sucrose intake and preference. *Physiol. Behav.* 1997; 62(2): 421-6.
26. Krupina N.A., Orlova I.N., Lukyanova L.D. Effect of course intake of bio-active flavonoids-containing plant preparation Extralife on the level of anxiety and sensorimotor reactivity in rats. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2014; (4): 30-9. (In Russian)
27. Valsamis B., Schmid S. Habituation and prepulse inhibition of acoustic startle in rodents. *J. Vis. Exp.* 2011; (55): e3446. doi: 10.3791/3446.
28. Gentsch C., Lichtsteiner M., Frischknecht H.-R., Feer H., Siegfried B. Isolation-induced locomotor hyperactivity and hypoalgesia in rats are prevented by handling and reversed by socialization. *Physiol. Behav.* 1988; 43: 13-6.
29. Domeney A., Feldon J. The disruption of prepulse inhibition by social isolation in the Wistar rat: how robust is the effect? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1998; 59(4): 883-90.
30. Powell S.B., Swerdlow N.R., Pitcher L.K., Geyer M.A. Isolation rearing-induced deficits in prepulse inhibition and locomotor habituation are not potentiated by water deprivation. *Physiol. Behav.* 2002; 77: 55-64.

Поступила 06.10.15

#### Сведения об авторах:

Хлебникова Надежда Николаевна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. общей патологии нервной системы, e-mail: nanikh@yandex.ru

Орлова Ирина Николаевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр., лаб. общей патологии нервной системы

Круглов С.В., Терехина О.Л., Смирнова Е.А., Кашаева О.В., Белкина Л.М.

## **Антиаритмическое действие олигонуклеотидов сопровождается активацией синтеза белка теплового шока HSP70 в сердце у крыс**

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

В последние годы появились данные, что олигонуклеотиды (ОГН) обладают защитным действием при различной патологии: они ограничивают развитие гипертрофии миокарда и сердечной недостаточности, тормозят онкологические процессы. Однако механизмы защитного действия олигонуклеотидов мало изучены. Так, неизвестно, связаны ли их протекторные эффекты с активацией синтеза белков теплового шока (heat shock protein, HSP). Цель исследования состояла в изучении влияния ОГН на аритмии, вызванные ишемией и реперфузией миокарда, и уровень HSP70 в сердце. В качестве источника ОГН был использован медицинский препарат «Деринат» (ФП «Техномедсервис», РФ). Крысам-самцам популяции Вистар предварительно вводили «Деринат» в течение 7 дней (в/м, 7,5 мг/кг). Аритмии оценивали в течение 10 мин локальной окклюзии левой коронарной артерии и 5 мин реперфузии. Белок HSP70 определяли в левом желудочке сердца методом Вестерн-блот анализа. В период ишемии препарат уменьшал длительность экстрасистолии в 13 раз и в 1,5 раза частоту возникновения желудочковой тахикардии. При реперфузии препарат уменьшал частоту возникновения желудочковой фибрилляции более чем в 2 раза, по сравнению с контролем, (соответственно 23% vs 56%) и в 5 раз ее длительность ( $8,4 \pm 2,3$  с vs  $48,1 \pm 18,7$  с). Деринат увеличивал уровень HSP70 в сердце на 65%. Заключение. Предполагается, что вызванная ОГН активация синтеза HSP70, является одним из механизмов, увеличивающих резистентность сердца к ишемическим и реперфузионным повреждениям миокарда.

**Ключевые слова:** олигонуклеотиды, стресс-белки, HSP70, ишемия миокарда, реперфузия, аритмии.

**Для цитирования:** Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015; 59(4): 16-20.

Kruglov S.V., Terekhina O. L., Smirnova E.A., Kashaeva O.V., Belkina L.M.

## **Antiarrhythmic effect of oligonucleotides accompanied by activation of HSP70 protein in the heart of rats**

Federal State Budgetary Scientific Department «Institution of General Pathology and pathophysiology» Moscow, 125315, Russia

The mechanisms of the protective effect of oligonucleotides (OGN) during pathological processes are poorly understood. The goal of this work was to study the effect of OGN on arrhythmias induced by myocardial ischemia and reperfusion, and the HSP70 level in the heart. As a source of OGN was used the drug «Derinat» («Technomedservis», Russia). In male Wistar rats were pre-treated the drug for 7 days (i/m, 7.5 mg/kg). The intensity of the arrhythmias was assessed by ECG during 10 min occlusion of the left coronary artery and subsequent 5 min of reperfusion. Protein HSP70 determined in the left ventricle of the heart by Western-blot analysis. During ischemia, this drug reduced duration of extrasystolia by 13 times and the incidence of ventricular tachycardia by 1.5 times. During reperfusion the drug reduced the incidence of ventricular fibrillation, a more than 2-fold, as compared with the control (respectively 23% vs 56%) and by 5 times its duration ( $8.4 \pm 2.3$  vs  $48.1 \pm 18.7$  sec). «Derinat» increased the HSP70 level in the heart by 65% compared with control. Conclusion: These data support the fact that the activation of HSP70 synthesis, induced by OGN is one of the mechanisms that increases the heart resistance to the ischemic and reperfusion damages.

**Key words:** oligonucleotides, stress-proteins, HSP70, arrhythmias, myocardial ischemia, reperfusion.

**For citation:** Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya. 2015; 59(4): 16-20.

**For correspondence:** Belkina L.M., e-mail: belkinal@yandex.ru



В последние годы появились данные, что олигонуклеотиды (короткие фрагменты ДНК) обладают защитным действием при разной патологии: они ограничивают развитие гипертрофии миокарда и сердечной недостаточности, связываясь с toll-подобным рецептором 9 (TLR9) [1], тормозят онкологические процессы [2]. Созданный на основе натуральных олигонуклеотидов препарат деринат (натриевая соль ДНК), обладает широким спектром терапевтических эффектов. Препарат широко используется для иммуннокоррекции при разных патологиях у детей и взрослых [3], а также в кардиологии [4, 5]. Есть данные об антиаритмическом действии дерината при действии адреналина [4]. Однако механизмы защитного действия олигонуклеотидов мало изучены. Так, неизвестно, связаны ли их протекторные эффекты с активацией синтеза белков теплового шока (heat shock protein, HSP). Известно, что HSP70 обладает кардиопротекторным действием при ишемических и реперфузионных повреждениях миокарда [6—8]. Защитное действие некоторых HSP, а именно, HSP70, обусловлено тем, что они участвуют в восстановлении и репарации поврежденных белков, выполняя функцию молекулярных шаперонов. Активация синтеза HSP70 происходит под действием денатурированных белков [9], активных форм кислорода [10] и оксида азота [11]. Установлено, что в индукции HSP70 участвует ядерный фактор транскрипции NF- $\kappa$ B (nuclear transcription factor  $\kappa$ B) [2]. Вместе с тем, есть данные, что активация NF- $\kappa$ B может происходить и под действием экзогенных ДНК [13], содержание которых в крови увеличивается при различной патологии [14]. Эти факты дают основание предположить, что одним из механизмов защитного действия олигонуклеотидов является активация синтеза HSP70.

Цель исследования состояла в изучении влияния олигонуклеотидов на аритмии, вызванные ишемией и реперфузией миокарда, и уровень HSP70 в сердце.

### Методика

В данной работе в качестве источника олигонуклеотидов был использован вышеуказанный препарат деринат (ФП «Техномедсервис», РФ). Крысам-самцам популяции Вистар массой 340—360 г препарат вводили в/м, однократно в течение 6 дней в дозе 7,5 мг/кг и на 7-й день за 40 мин до эксперимента. Контрольным крысам вводили физиологический раствор. опыты проводили под уретановым наркозом (1,5 г/кг, в/бр) при вскрытой грудной клетке и искусственной вентиляции легких атмосферным воздухом (аппарат ВИТА-1, СССР). Локальную ишемию миокарда вызывали путем перевязки

нисходящей ветви левой коронарной артерии на 10 мин, затем лигатуру распускали и в течение 5 мин проводили реперфузию. Одновременно регистрировали ЭКГ в I отведении с помощью полиграфа RM-6000 (фирмы Nihon-Koden, Япония). Критерием ишемии служили цианоз передней стенки и верхушки левого желудочка и подъем сегмента ST в I отведении. По ЭКГ подсчитывали длительность разного типа аритмий в секундах: экстрасистолии, желудочковой тахикардии, желудочковой фибрилляции и брадиаритмий. Оценивали также частоту аритмий, то есть количество животных, у которых возникали те или иные аритмии, результаты выражали в процентах от общего числа животных в группе.

Уровень индуцибельной HSP70 оценивали в левом желудочке сердца у крыс, не подвергавшихся ишемии и реперфузии миокарда. Деринат им вводили по выше описанной схеме в дозах 0,75 мг/кг и 7,5 мг/кг. Белок HSP70 определяли методом Вестерн-блот анализа. Содержание белка определяли с помощью поликлональных антител к HSP70 (Santa Cruz Biotechnology, США), стандарта HSP70 в качестве положительного контроля и вторых антител (Santa Cruz Biotechnology, США). Визуализацию антигенной мишени осуществляли по хемилюминесценции с использованием реактивов «ECL» («Amersham») и рентгенографической пленки («Kodac»). Количественную денситометрическую обработку полученных иммуноблотов проводили путем сканирования и анализа оптической плотности блотов с помощью компьютерной программы Photoshop. Результаты представляли в виде репрезентативных диаграмм, как отношение площади сигнала в пикселях к интенсивности сигнала.

Результаты обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента и U-критерия Вилкоксона—Манна—Уитни. Данные усреднялись по группам и приводились как среднее  $\pm$  SEM. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ . опыты проводили с соблюдением международных норм по гуманному обращению с экспериментальными животными.

### Результаты и обсуждение

ЧСС была сходной у контрольных крыс и у крыс, получавших деринат (соответственно  $340 \pm 16$  уд./мин и  $330 \pm 14$  уд./мин). Из таблицы видно, что деринат оказывал выраженное антиаритмическое действие при ишемии и реперфузии. В период ишемии антиаритмическое действие дерината в наибольшей степени проявлялось в отношении экстрасистолии, длительность которой в среднем была меньше, чем в контроле в 13 раз. Препарат в 1,5 раза

Влияние дерината на интенсивность аритмий при локальной ишемии и реперфузии миокарда

Серии опытов	Экстрасистолия		Желудочковая тахикардия		Желудочковая фибрилляция	
	Частота (%)	Длительность (с)	Частота (%)	Длительность (с)	Частота (%)	Длительность (с)
Ишемия						
Контроль (n = 9)	100	37,3 ± 15,6	56	7,7 ± 2,6	11	6,2 ± 5,2
Деринат (n = 13)	69	2,6 ± 0,8*	31	8,3 ± 3,1	8	6,0 ± 3,2
Реперфузия						
Контроль (n = 9)	67	2,4 ± 1,0	78	32,8 ± 9,5	56	48,1 ± 18,7
Деринат (n = 13)	61	6,1 ± 2,0	61	16,6 ± 3,7#	23	5,6 ± 2,3#

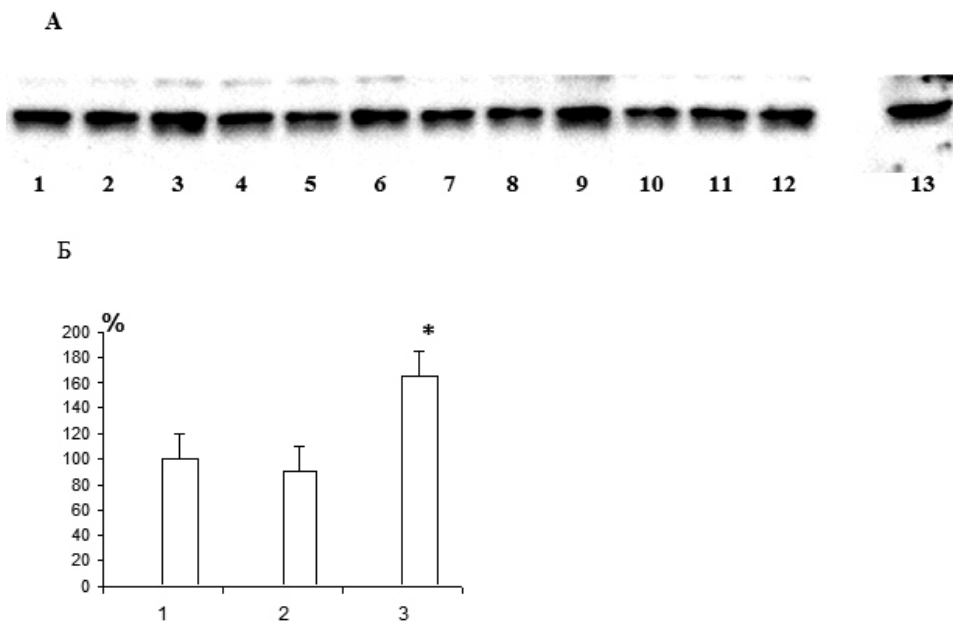
Примечание. Цифры в скобках — количество животных в каждой серии. \*)<0,05 — при сравнении с контролем по t-критерию Стьюдента; #)<0,05 — при сравнении с контролем по U-критерию Вилкоксона—Манна—Уитни.

уменьшал частоту возникновения желудочковой тахикардии. При реперфузии, в отличие от ишемии, у контрольных животных наблюдались более тяжелые нарушения ритма в виде частой и длительной фибрилляции желудочков и брадиаритмий. В этот период препарат не оказывал существенного влияния на выраженность экстрасистолии, но эффективно ограничивал развитие тяжелых аритмий: препарат уменьшал частоту возникновения желудочковой фибрилляции более чем в 2 раза, по сравнению с контролем, и в 5 раз ее длительность. Кроме того, в группе, получавшей деринат, не было ни одного случая остановки сердца от желудочковой фибрилляции, в то время как в контроле остановка наблюдалась в 22% случаев. Деринат уменьшал частоту тяжелых брадиаритмий

с 44% в контроле до 30%, а их длительность с 11—28 с в контроле до 5—14 с. Во время реперфузии препарат не влиял на частоту желудочковой тахикардии, но в 2 раза уменьшал ее длительность.

Деринат вызывал значительную активацию системы HSP70 в сердце. На рис. 1А и 1Б видно, что препарат в дозе 7,5 мг/кг увеличивал уровень HSP70 на 65%, по сравнению с контролем, в то время как на порядок меньшая доза препарата не влияла на уровень белка.

Полученные результаты показали, что антиаритмическое действие олигонуклеотидов, содержащихся в деринате, сопровождается увеличением уровня HSP70 в сердце. Представленные результаты согласуются с данными других исследований. Так, показана



Влияние дерината на уровень HSP70 в сердце у крыс. А — репрезентативные иммуноблоты HSP70: 1,4,7,10 — контроль, 2, 5, 8, 11 — деринат в дозе 0,75 мг/кг, 3, 6, 9, 12 — в дозе 7,5 мг/кг, 13 — маркер HSP70. Б — по оси ординат уровень HSP70 в процентах к контролю, принятому за 100%. По оси абсцисс: 1 — контрольные крысы, 2 и 3 — крысы, получавшие деринат соответственно в дозах 0,75 мг/кг и 7,5 мг/кг \*) <0,05 — достоверно по сравнению с контролем по U-критерию Вилкоксона—Манна—Уитни.

но, что при ишемии/реперфузии миокарда уровень HSP70 уменьшается, в то время как активация синтеза белка путем блокады его ингибитора оказывает защитное действие [8]. Известно, что клеточной основой возникновения аритмий при ишемии и реперфузии миокарда, является нарушение ионной проницаемости мембран, обусловленной повреждением мембраносвязанных ферментов, регулирующих ионные каналы. Белки HSP70, функционируя как шапероны, тормозят дисфункцию мембранных ферментов и соответственно нарушения ионной проводимости, тем самым ограничивая развитие аритмий. Спектр защитного действия HSP70 может быть довольно широким. В данной работе антиаритмический эффект дерината был особенно выражен при реперфузии миокарда. Как известно, реперфузионные, а в сущности, реоксигенационные, повреждения миокарда обусловлены резкой активацией перекисного окисления липидов. Показано, что HSP70 обладают антиоксидантной активностью, стимулируя активацию супероксиддисмутазы [15]. Не исключено, что ранее показанные антиоксидантные свойства дерината [16] связаны также с активацией синтеза HSP70. Защитный эффект HSP70 может быть связан и с защитой ферментов дыхательной цепи митохондрий, что препятствует истощению АТФ [15]. Показана также способность HSP70 ограничивать внутриклеточную аккумуляцию кальция [18]. Возможно, фрагменты ДНК способны индуцировать и другие HSP с защитными свойствами, например HSP20, кардиопротекторный эффект которого при ишемии и реперфузии миокарда связан с увеличением эффективности  $Ca^{2+}$  транспорта СПР [19]. В целом, описанные механизмы препятствуют дегенерации кардиомиоцитов благодаря цитопротекторным и репаративным свойствам дерината.

При анализе механизмов индукции HSP70 под действием олигонуклеотидов есть основание предположить, что иммуномодулирующая функция дерината сопровождается активацией синтеза HSP70. Показано, что одноцепочная ДНК через TLR-рецепторы, являющиеся главными компонентами системы врожденного иммунитета, вызывают активацию NF- $\kappa$ B [13], который играет важную роль в каскаде иммунных реакций. Установлено, что TLR-рецепторы 3, 7, 8 и 9, располагающиеся внутриклеточно на поверхности эндосом, способны связываться с нуклеиновыми кислотами. После связывания TLR-рецепторов с лигандом одним из путей передачи внутриклеточного сигнала обеспечивается включением адаптерного белка MyD88 (белок первичного ответа миелоидной дифференцировки 88), который активирует NF- $\kappa$ B. Последний инициирует в ядре транскрипцию генов не только провоспалительных цитокинов, но и многих

других генов, в том числе, как уже указывалось, и HSP70 [12]. Вполне вероятно, что фрагменты ДНК, содержащиеся в препарате деринат, индуцируют активацию синтеза HSP70 по такому же механизму, то есть, реализуется та же цепочка событий, в результате которых происходит активация NF- $\kappa$ B с последующей индукцией HSP70. Полученные результаты говорят в пользу того, что вызванная олигонуклеотидами активация синтеза HSP70, является одним из механизмов, увеличивающих резистентность сердца к ишемическим и реперфузионным повреждениям миокарда.

## References

1. Yang L., Cai X., Liu J., Jia Z., Jiao J., Zhang J. et al. CpG-ODN attenuates pathological cardiac hypertrophy and heart failure by activation of PI3K $\alpha$ -Akt signaling. *PLoS One*. 2013; 8(4): e62373.
2. Alyamkina E.A., Lixacheva A.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Dolgova E.V., Rogachev V.A. i dr. The action of the exogenous DNA associated with protamine on the experimental tumors growth of mice. *Voprosy onkologii*. 2009; 55(6): 765-8. (in Russian)
3. Kaplina E.N., Vajnberg Yu.P. Derinat. The natural immunomodulator for children and adults. Moskva: Nauchnaya kniga; 2005. (in Russian)
4. Svyatkina O.I., Balashov V.P., Balykova L.A., Shhukin S.A. Antiarrhythmic activity of Derinat under the experimental conditions. *Ekspierimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya*. 2004; 1: 22-4. (in Russian)
5. Zubeeva G.N., Kopejkina I.A., Goroxova Z.A., Motylev I.M. Echocardiographic parameters of myocardial contractility in patients with atrial fibrillation in the treatment by immunomodulators. *Vestnik aritmologii*. 2005; №39. Suppl A. 37-81. (in Russian)
6. Mestrlil R., Chi S.H., Sayen M.R., O'Reilly K., Dillmann W.H. Expression of inducible stress protein 70 in rat heart myogenic cells confers protection against simulated ischemia-induced injury. *J Clin Invest*. 1994; 93(2): 759-67.
7. Chiu J.H., Cheng Y.F., Wang J.Y., Hsu CF. Remote pharmacological preconditioning on median nerve territory increases Hsp32 expression and attenuates ischemia-reperfusion injury in rat heart. *Life Sci*. 2012; 90(17-18): 629-36.
8. Zhao B., Sun G., Feng G., Duan W., Zhu X., Chen S. et al. Carboxy terminus of heat shock protein (HSP) 70-interacting protein (CHIP) inhibits HSP70 in the heart. *J Physiol Biochem*. 2012; 68(4): 485-91.
9. Matts R.L., Hurst R. The relationship between protein synthesis and heat shock proteins levels in rabbit reticulocyte lysates. *J Biol Chem*. 1992; 267(25): 18168-74.
10. Kukreja R.C., Kontos M.C., Loesser K.E., Batra S.K., Qian Y.Z., Gbur C.J. Jr. et al. Oxidant stress increases heat shock protein 70 mRNA in isolated perfused rat heart. *Am J Physiol*. 1994; 267(6 Pt 2): H2213-H2239.
11. Malyshev I.Yu., Manukhina E.B., Mikoyan V.D., Kubrina L.N., Vanin A.F. *FEBS Lett*. 1995; 370(3): 159-62.
12. Wilhide M.E., Tranter M., Ren X., Chen J., Sartor M.A., Medvedovic M., Jones W.K. Identification of a NF- $\kappa$ B cardioprotective gene program: NF- $\kappa$ B regulation of Hsp70.1 contributes to cardioprotection after permanent coronary occlusion. *J Mol Cell Cardiol*. 2011; 51(1): 82-9.

13. Wagner H., Bauer S. All is not Toll: new pathways in DNA recognition *J Exp Med.* 2006; 203(2): 265-8.

14. Laktionov P.P., Tamkovich S.N., Rykova E.Yu., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P. et al. Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2004; 23(6-7): 879-83.

15. Suzuki K., Murtuza B., Sammut I.A., Latif N., Jayakumar J., Smolenski R.T. et al. Heat shock protein 72 enhances manganese superoxide dismutase activity during myocardial ischemia-reperfusion injury, associated with mitochondrial protection and apoptosis reduction. *Circulation.* 2002; 106(12 Suppl 1): I270-6.

16. Konoplya A.A., Petrov S.V., Gavrilyuk V.P. Correction of the immune, cytokine and antioxidant status in patients with chronic salpingo-oophoritis. *Medicinskaya immunologiya.* 2006; 8(1): 97-100. (in Russian)

17. Vogt S., Portig I., Iqrsusi M., Ruppert V., Weber P., Ramzan R. Heat shock protein expression and change of cytochrome c oxidase activity: presence of two phylogenic old systems to protect tissues in ischemia and reperfusion. *J Bioenerg Biomembr.* 2011; 43(4): 425-35.

18. Szenczi O., Kemecei P., Miklys Z., Ligeti L., Snocckx L.H., van Riel N.A. et al. In vivo heat shock preconditioning mitigates calcium overload during ischaemia/reperfusion in the isolated, perfused rat heart. *Pflugers Arch.* 2005; 449(6): 518-25.

19. Qian J., Vafiadaki E., Florea S.M., Singh V.P., Song W., Lam C.K. et al. Small heat shock protein 20 interacts with protein phosphatase-1 and enhances sarcoplasmic reticulum calcium cycling. *Circ Res.* 2011; 108(12): 1429-38.

Поступила 02.11.15

#### Сведения об авторах:

Круглов Сергей Васильевич (*Kruglov S.V.*), канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. биоэнергетики и проблем гипоксии, e-mail: sergey9273@yandex.ru

Терехина Ольга Леонидовна (*Terekhina O.V.*), науч. сотр. лаб. биоэнергетики и проблем гипоксии, e-mail: terminator-ola@yandex.ru

Смирнова Елена Александровна (*Smirnova E.A.*), канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. биоэнергетики и проблем гипоксии, e-mail: smelal@yandex.ru

Кашаева Ольга Викторовна (*Kashaeva O.V.*), канд. мед. наук, доцент кафедры «Патологической физиологии» Московский Медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, e-mail: kashaeva@derinat.ru

Левин Г.Я., Сухарева Е.Г., Егорихина М.Н.

## **О роли микровезикуляции эритроцитов и гликирования гемоглобина в гемореологических нарушениях при ожоговой болезни**

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

**Введение.** Гемореологические нарушения играют важную роль в патогенезе острого периода ожоговой болезни. Механизм этих нарушений остается мало изученным. В частности, неизвестна роль гликирования гемоглобина, а также микровезикуляции эритроцитов в снижении их деформируемости после термической травмы. **Методика.** Исследование проведено на 30 образцах крови больных в острый период ожоговой болезни и 40 образцах крови здоровых людей. Оценка количества и стандартизация концентрации эритроцитарных микровезикул проводилась на проточном цитофлуориметре после их осаждения с помощью ультрацентрифугирования при 100000g, в течение 60 мин. Электрофоретическую подвижность эритроцитов определяли в специальной камере оптической кюветы, в поле зрения светового микроскопа. Деформируемость эритроцитов оценивали по степени их вытяжения в искусственном сдвиговом потоке. **Результаты и обсуждение.** Установлено, что содержание HbA<sub>1c</sub> в эритроцитах ожоговых больных оказалось почти в два раза более высоким, чем в норме. В опытах *in vitro* подтвердилось зависимость деформируемости эритроцитов от степени гликирования Hb. Гликирование Hb приводит к повышению ригидности эритроцитов также путем увеличения их микровезикуляции. Число выделяющихся из эритроцитов ожоговых больных микровезикул в 3,47 раза превышает норму. Важной причиной микровезикуляции является дестабилизация липидного комплекса мембраны эритроцитов, которая сопровождается повышением отрицательного заряда эритроцитов. Можно заключить, что гликирование Hb и перераспределение фосфолипидов мембраны эритроцитов являются важными причинами усиления их микровезикуляции и сопровождаются снижением деформируемости эритроцитов после термической травмы.

**Ключевые слова:** эритроциты; микровезикулы; ожоговая болезнь; электрофоретическая подвижность эритроцитов; гликированный гемоглобин; деформируемость эритроцитов.

**Для цитирования:** Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015; 59(4): 21-25.

Levin G.Ya., Sukhareva E.G., Egorihina M.N.

## **The role of erythrocyte microvesiculation and hemoglobin glycation in hemorheological disorders during burn injury**

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

**Introduction.** Hemorheological disorders play an important part in pathogenesis of acute period of burn injury. This mechanism remains practically unstudied. Thus, unknown is the role of hemoglobin glycation and erythrocyte microvesiculation in the decrease in erythrocyte deformability after thermal trauma. **Methods.** Research was performed on 30 blood samples of burn patients in the acute period and 40 blood samples of healthy donors. The number of erythrocyte-derived microvesicles was determined by flow cytometry and then standardized in the samples; the microvesicles were preliminarily separated by ultracentrifugation at 100000g, for 60 minutes. Electrophoretic mobility of erythrocytes was measured in a processing chamber of the optical cuvette under the light microscope. Deformability of erythrocytes was assessed by the level of their extension in the artificial shear flow. **Results.** It was found that the amount of HbA<sub>1c</sub> in red blood cells of burn patients demonstrated a 2-fold increase compared to healthy donors. In the experiments *in vitro* it was proved that deformability of erythrocytes correlates with the level of hemoglobin glycation. Hb glycation leads to the increased rigidity of erythrocytes also by increasing their microvesiculation. The number of microvesicles derived from red blood cells of burn patients demonstrated a 3.47-fold increase compared to healthy donors. An important reason for microvesiculation is the destabilization of lipid complex of erythrocyte membrane, which is accompanied by the increase in

**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

*the erythrocyte negative charge. It can be concluded that Hb glycation and redistribution of erythrocyte membrane phospholipids are the important reasons for the increase erythrocyte microvesiculation and are accompanied by the decrease in erythrocyte deformability after thermal trauma.*

**Keywords:** erythrocytes; microvesicles; burn injury; electrophoretic mobility of erythrocytes; glycated hemoglobin; erythrocyte deformability.

**For citation:** *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya. 2015; 59(4): 21-25.*

**For correspondence:** Levin G.Ya., e-mail: levin@unn.ac.ru

В патогенезе ожоговой болезни важную роль играют нарушения реологических свойств крови, прежде всего — деформируемости эритроцитов [1, 2]. Она обуславливается такими факторами, как внутренней вязкостью (концентрацией внутриклеточного Hb), эластическими и вязкостными свойствами мембраны, которые также в определенной степени связаны с наличием в ней Hb, особенно его гликированной формы, клеточной геометрией эритроцитов [3, 4]

Ряд факторов, ухудшающих деформируемость эритроцитов при ожоговой болезни, остается практически неизученным. Прежде всего, это относится к роли гликированного гемоглобина (HbA<sub>1c</sub>) в деформируемости эритроцитов после термической травмы. Известно, что HbA<sub>1c</sub> увеличивает внутриклеточную вязкость красных клеток крови. Кроме того, HbA<sub>1c</sub> участвует в мембранной организации эритроцитов, о чем свидетельствует, в частности, феномен образования серповидной и других форм эритроцитов при различных гемоглобинопатиях. Лишь в последние годы стал исследоваться вопрос о роли микровезикуляции эритроцитов в изменениях их деформируемости [5, 6]. С одной стороны, образующиеся микровезикулы (МВ) могли бы удалять HbA<sub>1c</sub> с мембран эритроцитов, но с другой — нарушать соотношение площади поверхности и объема эритроцита и, тем самым, снижать их способность к деформации. Эта проблема практически не исследовалась при ожоговой болезни, также как и вопрос об активности микровезикуляции эритроцитов после термической травмы.

Целью настоящего исследования являлось изучение содержания HbA<sub>1c</sub> в эритроцитах, их мембранах и образующихся из них МВ в ранний период ожоговой болезни, активности процесса микровезикуляции эритроцитов и связи его с отрицательным зарядом красных клеток крови.

### Методика

Исследование проведено на 30 образцах крови больных в острый период ожоговой болезни (ожог II—III степени, более 20% поверхности тела, в возрасте от 18 до 65 лет) и 40 образцах крови здоровых людей. Кровь стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1, и центрифугировали 20 мин при 3000 об/мин. После этого отделяли бес-

тромбоцитарную плазму, удаляли лейкоцитарно-тромбоцитарную пленку и выделяли эритроцитарную массу. Последнюю трижды отмывали в физиологическом растворе, а затем ресуспензировали в трис-HCl буфере (рН 7,4) в соотношении 2:1 и инкубировали при 37°C в течение 24 часов. В процессе хранения отмывтых эритроцитов происходит накопление МВ [7]. После инкубации эритроциты осаждали с помощью центрифугирования в течение 20 мин при 3000 об/мин, затем надосадочную жидкость, согласно методике Dey-Hazra [8], очищали от клеточного дегриса.

Оценка количества и стандартизация концентрации эритроцитарных микровезикул (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 [9]. Стандартизация числа эМВ в пробах проводилась путем разбавления образцов и доведения количества МВ до 5000 ± 512 в мкл.

После 24 часовой инкубации из эритроцитов выделяли их мембраны, следующим образом: 0,5 мл эритроцитов гемолизировали в 1,5 мл дистиллированной воды и центрифугировали при 21380 g в течение 20 мин. Затем надосадочную жидкость удаляли, вновь добавляли 1,5 мл дистиллированной воды, в ней ресуспензировали осадок и центрифугировали при тех же параметрах. Отмывание мембран от Hb повторяли 9 раз, пока надосадочная жидкость не становилась прозрачной.

Количество HbA<sub>1c</sub> в эритроцитах, их мембранах и МВ определяли с помощью набора «Гликогемотест» («ЭЛТА», Россия) согласно инструкции. Содержание HbA<sub>1c</sub> как в самих красных клетках крови, так и в их мембранах, а также в выделенных из них МВ выражали как в абсолютных величинах (в г/л), так и в процентах от общего Hb.

Количество Hb в эритроцитах, мембранах и МВ определяли гемихромным методом: 0,02 мл эритроцитарной массы, мембран или МВ растворяли в 5 мл раствора SDS (0,06%). Через 20 мин после полного растворения регистрировали оптическую плотность при λ = 540 нм на спектрофотометре Spekol UV VIS (Zeiss, Германия).

Электрофоретическую подвижность эритроцитов (ЭФПЭ) определяли следующим образом: 40 мкл 0,1% суспензии эритроцитов в трис-НСl буфере (рН 7,4), помещали в рабочую камеру оптической кюветы на предметном столике микроскопа, в которую опускали Ag/AgCl-электроды. Наблюдение за движением клеток вели при +25°C и силе тока 8 мА в поле зрения светового микроскопа, измеряя время прохождения клеткой расстояния 10 мкм. Фиксировали перемещение 10 клеток. Вычисляли среднее значение. Величину ЭФПЭ определяли по формуле:

$$U = S/TH,$$

где:

S — расстояние, на которое перемещалась клетка;

T — время перемещения клетки на расстояние S;

H — градиент потенциала.

Величину градиента потенциала определяли по формуле:

$$H = I/g\chi,$$

где:

I — сила тока;

g — поперечное сечение камеры;

$\chi$  — удельная электропроводимость среды.

Кроме того, исследовали влияние гликирования Hb на деформируемость эритроцитов в опытах *in vitro*. Эритроцитарную массу, приготовленную и отмытую описанным выше способом, разделяли на 2 части. В одну часть добавляли трис-НСl буфер (рН 7,4), а во вторую часть — раствор глюкозы в трис-НСl буфере (рН 7,4) с концентрацией 100 ммоль/л, в соотношении 1:3. Смеси инкубировали при 4°C в течение 20 часов. После инкубации эритроцитарную массу дважды отмывали физиологическим раствором с помощью центрифугирования в течение 20 мин при 3000 об./мин. Количество HbA<sub>1c</sub> в эритроцитах определяли описанным выше способом.

Деформируемость эритроцитов определяли с помощью ригидометра [10]. Принцип действия его заключался в следующем: суспензия эритроцитов помещалась между двумя коаксиальными цилиндрами, создавался ламинарный поток, в котором эритроциты деформировались (вытягивались) и фиксировались в этом положении с помощью 0,8% раствора глютаральдегида. В поле зрения светового микроскопа подсчитывали количество деформированных (вытянутых) и недеформированных эритроцитов. Степень деформируемости эритроцитов выражалась в процентном отношении деформированных клеток к недеформированным.

Результаты исследований обработаны с использованием методов непараметрической статистики с при-

менением критерия парных сравнений Вилкоксона при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0.

## Результаты и обсуждение

Как показали проведенные исследования, содержание HbA<sub>1c</sub> в эритроцитах ожоговых больных, выраженное как в процентах от Hb, так и в г/л, оказалось значительно более высоким, чем в эритроцитах здоровых доноров. При этом после 24 часов хранения отмытых эритроцитов при 37°C, содержание HbA<sub>1c</sub> в красных клетках крови, как здоровых доноров, так и ожоговых больных, снижалось в среднем на 34% (HbA<sub>1c</sub> выраженный в процентах) и на 22% (HbA<sub>1c</sub> выраженный в г/л) (табл. 1). Снижение концентрации HbA<sub>1c</sub> в эритроцитах и их мембранах в процессе инкубации в условиях нашего эксперимента связано, вероятнее всего, с отсутствием глюкозы в составе трис-НСl буфера, в котором хранились красные клетки крови.

Установлено, что после 24 часов инкубации эритроцитов здоровых доноров содержание в их мембранах HbA<sub>1c</sub>, выраженное в г/л, нарастало, причем в мембранах, эритроцитов ожоговых больных — в меньшей степени (табл. 1).

Кроме этого, изучали содержание HbA<sub>1c</sub> в МВ, выделенных из эритроцитов после 24-часовой инкубации эритроцитов. Установлено, что концентрация HbA<sub>1c</sub> в эМВ ожоговых больных значительно выше, чем в эМВ здоровых доноров, причем как в абсолютных величинах, так и в процентах от общего Hb (табл. 1).

В исследованиях ЭФПЭ при ожоговой болезни установлено, что она была в 1,8 раза выше, чем ЭФПЭ здоровых доноров (табл. 2). После 24-часовой инкубации эритроцитов ЭФП снижалась, однако при ожоговой болезни ее уровень оставался выше контроля на 51%.

Как показали результаты опытов *in vitro*, количество HbA<sub>1c</sub> в эритроцитах после инкубации с глюкозой в течение 20 часов увеличивалось и приближалось к значению HbA<sub>1c</sub> в эритроцитах ожоговых больных. Было установлено, что деформируемость эритроцитов при этом значительно снижалась. Если количество вытянутых (деформированных) эритроцитов, выделенных из крови здоровых доноров, составляло после 20-часовой инкубации в среднем 50,0 ± 3,6%, то после инкубации эритроцитов с глюкозой количество, вытянутых в искусственном сдвиговом потоке клеток снижалось до 31,2 ± 2,4%.

Как свидетельствуют литературные данные, при ожоговой болезни, особенно в ее ранний период, значительно ухудшается микроциркуляция, важнейшей причиной чего является снижение деформируемости

эритроцитов [11]. Нами установлено, что в повышении ригидности эритроцитов после термической травмы важную роль играет увеличение содержания в эритроцитах  $\text{HbA}_{1c}$ . Это согласуется с данными литературы о том, что снижение деформируемости эритроцитов при сахарном диабете связано с гликированием  $\text{Hb}$ , а отсюда — с увеличением внутриэритроцитарной вязкости [12]. Особо важное значение имеют полученные нами результаты, свидетельствующие об увеличении  $\text{HbA}_{1c}$  в мембранах эритроцитов после ожога, что обуславливает ухудшение эластических и вязкостных свойств мембран.

По результатам опытов *in vitro*, также отмечена достаточно высокая корреляционная зависимость между повышением концентрации  $\text{HbA}_{1c}$  в инкубированных в растворе глюкозы эритроцитах и снижением количества сильно вытянутых в искусственном сдвиговом потоке красных клеток крови ( $R = -0,59$ ,  $\rho = 0,016$ ), а также между степенью повышения концентрации  $\text{HbA}_{1c}$ , и увеличением количества невытянутых (недеформированных) эритроцитов ( $R = 0,51$ ,  $\rho = 0,043$ ).

Гликирование  $\text{Hb}$  не только само по себе вызывает ухудшение деформируемости эритроцитов, но и приводит к повышению их ригидности путем увеличения микровезикуляции красных клеток крови. О таком влиянии  $\text{HbA}_{1c}$  на процесс образования эМВ свидетельствуют исследования F.L. Willekens et al. [13].

По данным, полученным с помощью проточной цитофлуориметрии, количество эМВ после 24-часовой инкубации эритроцитов по сравнению с нормой

увеличено в 3,47 раза у ожоговых больных (в среднем с  $266,2 \pm 33,2$  до  $924,2 \pm 97,1$  шт/ в 1 мкл).

Усиление микровезикуляции эритроцитов ожоговых больных является, вероятно, объяснением того факта, что после инкубации содержание в их мембранах  $\text{HbA}_{1c}$ , выраженное в г/л, нарастало в меньшей степени, чем в мембранах эритроцитов здоровых доноров. При ожоге значительная часть мембранного  $\text{HbA}_{1c}$  «уходит» в микровезикулы.

Образование МВ является по данным ряда авторов защитным механизмом для удаления молекул, связанных с участками мембраны эритроцита, в том числе и измененного, мембраносвязанного  $\text{Hb}$  и его токсических производных, задерживая тем самым, несвоевременное удаление эритроцитов из кровотока, что приводит к продлению жизни эритроцитов *in vivo* [14]. Однако удаление части мембран при микровезикуляции сопровождается во-первых, нарушением геометрии эритроцитов, а во-вторых — повышением внутриклеточной вязкости за счет относительного увеличения концентрации в клетке  $\text{Hb}$ , в том числе — его гликированной формы. Это, несомненно, вызывает снижение способности эритроцитов значительно деформироваться при прохождении через капилляры.

Важной причиной микровезикуляции является дестабилизация липидного комплекса мембраны эритроцитов. В результате этого происходит перераспределение фосфолипидов — нейтральные фосфолипиды (прежде всего фосфатидилхолин) с внешней стороны мембраны переходят на внутреннюю, а несущие отри-

Таблица 1

Содержание  $\text{HbA}_{1c}$  в эритроцитах, их мембранах и выделенных из них МВ

Объект исследования	Группа исследования	Эритроциты здоровых доноров		Эритроциты ожоговых больных	
		$\text{HbA}_{1c}$ , %	$\text{HbA}_{1c}$ , г/л	$\text{HbA}_{1c}$ , %	$\text{HbA}_{1c}$ , г/л
Эритроциты	Контроль	$6,78 \pm 0,631$	$12,48 \pm 1,032$	$8,77 \pm 0,885$	$21,49 \pm 2,233$
	Опыт	$4,27 \pm 0,381^*$	$9,61 \pm 0,982^*$	$6,08 \pm 0,591^*$	$17,08 \pm 1,696^*$
Мембраны	Контроль	$5,84 \pm 0,614$	$0,35 \pm 0,031$	$6,74 \pm 0,638$	$0,61 \pm 0,057$
	Опыт	$4,98 \pm 0,431$	$0,50 \pm 0,044^*$	$6,03 \pm 0,563$	$0,72 \pm 0,071$
МВ	Опыт	$4,56 \pm 0,479$	$0,14 \pm 0,021$	$5,78 \pm 0,612$	$0,29 \pm 0,031$

Примечание. Контроль — до инкубации; Опыт — после 24-часовой инкубации; \* —  $p < 0,05$  в сравнении с контролем, критерий Вилкоксона.

Таблица 2

Изменение ЭФП эритроцитов в процессе консервации

Группа исследования	ЭФП эритроцитов здоровых доноров, мкм x см/В x с	ЭФП эритроцитов ожоговых больных, мкм x см/В x с
Контроль	$7,78 \pm 0,781$	$13,72 \pm 1,291$
Опыт	$4,33 \pm 0,452^*$	$6,53 \pm 0,658^*$

Примечание. Контроль — до инкубации; Опыт — после 24-часовой инкубации; \* —  $p < 0,05$  в сравнении с контролем, критерий Вилкоксона.



цательный заряд (фосфатидилсерин — ФС) — с внутренней стороны на внешнюю. При этом мембрана, обогащенная ФС, приобретает отрицательный заряд [15].

С достаточным основанием можно полагать, что показанное в наших исследованиях значительное увеличение ЭФП эритроцитов ожоговых больных связано с происходящим в их мембранах перераспределением фосфолипидов, которое и является одной из важных причин усиления микровезикуляции эритроцитов после термической травмы.

### Заключение

Таким образом, нами установлено, что при ожоговой болезни значительно увеличивается гликирование Hb, и нарастает концентрация HbA<sub>1c</sub> как внутри эритроцитов, так и в их мембранах. Гликирование Hb и дестабилизация липидного комплекса мембраны эритроцитов являются важными причинами усиления микровезикуляции красных клеток крови и сопровождаются снижением деформируемости эритроцитов после термической травмы.

### References

1. Braasch D., Rogausch H. Decreased red-cell deformability after severe burns, determined with the chlorpromazine test. *Pflugers. Arch.* 1971; 323(1): 41-9.
2. Baar S. The functional significance of red cell deformability and its significance in burns. *Burns.* 1979; 6: 85-90.
3. Chien S. Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Annu. Rev. Physiol.* 1987; 49: 177-92.
4. Mohandas N., Chasis J.A. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. 1993; 30: S171-92.
5. Levin G.Ya., Sukhareva E.G. ship between erythrocyte deformability with glycation of hemoglobin and the formation of microvesicles. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal.* 2015; 35 (2): 37-42. (in Russian)

6. Orlov D., Karkouti K. The pathophysiology and consequences of red blood cell storage. *Anaesthesia.* 2015; 70 (Suppl. 1): 29-37.

7. 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.

8. 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.

9. 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.

10. Levin G.Ya., Yakhno V.G., Tsarevskiy N.N., Kotyayeva N.P. *A device for the deformation of erythrocytes in a shear flow.* Certificate of authorship 1363065, RF; 1987. (in Russian)

11. Bekyarova G., Yankova T., Kozarev I, Yankov D. Reduced erythrocyte deformability related to activated lipid peroxidation during the early postburn period. *Burns.* 1996; 22(44): 291-4.

12. Sorette M.R., Lavenant M.G., Clark M.R. Ektacytometric measurement of sickle cell deformability as a continuous function of oxygen tension. *Blood.* 1987; 69(1): 316-23.

13. Willekens F.L., Werre J.M., Kruijt J.K., Roerdinkholder-Stoelwinder B., Groenen-Dopp Y.A., van den Bos A.G. et al. Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood.* 2005; 105: 2141-5.

14. Willekens F.L., Werre J.M., Groenen-Dopp Y.A., Roerdinkholder-Stoelwinder B., de Pauw B., Bosman G.J. Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? *Br. J. Haematol.* 2008; 141(4): 549-56.

15. Zwaal R.F., Schroit A.J. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood.* 1997; 89: 1121-32.

Поступила 02.11.15

### Сведения об авторах:

Сухарева Екатерина Геннадьевна (Sukhareva E.G.), мл. науч. сотр. отделения гравитационной хирургии и гемодиализа, e-mail: ekaterina.syhareva@gmail.com

Егорихина Марфа Николаевна (Egorihina M.N.), ст. науч. сотр. отделения гравитационной хирургии и гемодиализа, e-mail: egorihina@rambler.ru

Тихомирова Л.Н., Сафина Н.Ф., Тараканов И.А.

## **Роль опиоидергической и ГАМКергической систем в регуляции механочувствительности дыхательной системы у крыс**

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

*В опытах на наркотизированных беспородных белых крысах-самцах исследовали изменение чувствительности механорецепторного контура дыхательной системы под действием агониста опиоидных рецепторов морфина и агониста ГАМК-рецепторов фенибутта. Двусторонняя перерезка блуждающих нервов, произведенная через 30 мин после системного введения морфина вызывает выраженное нарушение дыхательного ритма, а на фоне фенибутта — существенных изменений ритма или показателей вентиляции легких не выявлено. Активация опиоидных рецепторов морфином не оказывает существенного влияния на работу механорецепторного контура регулирования дыхательного ритма, и перерезка блуждающих нервов на этом фоне увеличивает вероятность возникновения нарушений дыхательного ритма. Активация ГАМКергической системы фенибуттом существенно ослабляет влияние механорецепторного контура на регуляцию дыхательных параметров, вплоть до эффекта «центральной ваготомии», то есть до полного отсутствия изменений характера дыхания в ответ на пересечение блуждающих нервов.*

**Ключевые слова:** опиоидергическая система; морфин; ГАМКергическая система; фенибут; механорецепторы дыхательных путей и легких; крыса.

**Для цитирования:** Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015; 59(4): 26-29.

Tikhomirova L.N., Safina N.F., Tarakanov I.A.

## **The role of opioidergic and GABAergic systems in the mechanosensitivity regulation of the respiratory system in rats**

Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», Baltiyskaya str., 8, Moscow, 125315, Russia

*In anaesthetized white outbred male rats we investigated the change of respiratory mechanoreceptors sensitivity to morphine and phenibut. Bilateral transection of the vagus nerves causes a severely slowdown of respiratory rate in 30 minutes after the systemic administration of morphine, however after administration of phenibut the respiratory rate and other respiration parameters have not changed significantly. It means that the activation of opioid receptors by morphine does not significantly affect the function of the respiratory mechanoreceptor control loop, and transection of the vagus nerves on this background increases the probability of respiratory rhythm disorders. Activation of GABAergic system by phenibut significantly weakened the impact of the regulating contour of the respiratory mechanoreceptor on breathing parameters, up to effect of «central vagotomy»: that is, to no changes in respiratory parameters after cutting the vagus nerves.*

**Keywords:** opioidergic system, morphine, GABAergic system, phenibut, airways and lungs mechanoreceptors, rat.

**For citation:** *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2015; 59(4): 26-29.

**For correspondence:** Tarakanov I.A., e-mail: beta003@rambler.ru

Тяжелые нарушения дыхательного ритма, встречающиеся в клинической практике, обычно обусловлены ишемией и гипоксией мозга [1]. Вследствие продолжительной гипоксии и ишемии мозга изменяется метаболизм нейронов и глии, что приводит к выделению и накоплению в нервной ткани большого количества тормозных нейромедиаторов. Особое место

среди медиаторов гипоксического метаболизма занимает ГАМК и эндогенные опиоиды, активно участвующие в центральной регуляции дыхательного ритма [1—3] и боли [4].

Дыхательная система содержит два основных контура регулирования: хеморецепторный и механорецепторный [5]. Контур механорецепторного регулирования

ния включает эфферентные пути, дыхательные мышцы, вентиляторный аппарат, механорецепторы легких и мышц, афферентные (механочувствительные) пути и замыкается через дыхательный центр [5].

Для нормальной регуляторной деятельности дыхательному центру необходима афферентная информация от рецепторов входящих в цепи обратной связи, следящие за выполнением дыхательных движений. Контроль над механическими показателями легочной функции осуществляют главным образом механорецепторы легких, которые являются основными чувствительными элементами механорецепторного контура [6, 7]. Импульсация от нескольких типов механорецепторов легких и дыхательных путей поступает в дыхательный центр по блуждающим нервам. В связи с этим возникает вопрос, как в условиях дополнительной активации ГАМК- и опиоидергической систем изменяется деятельность механорецепторного контура регуляции. В задачу данного исследования входила сравнительная оценка значения ГАМКергической и опиоидергической систем в передаче информации от механорецепторов легких и дыхательных путей к нейронам дыхательного центра.

### Методика

Эксперименты проводили на 44 беспородных белых крысах самцах массой 350—500 г, наркотизированных пентобарбиталом натрия (50 мг/кг внутрибрюшинно). Температуру тела поддерживали в интервале 37,5—38,5°C с помощью инфракрасной лампы.

Использовали свежеприготовленные растворы фенибута (10% раствор) (неспецифического ГАМК-агониста) и морфина (1% раствор) (агониста  $\mu$ -опиоидных рецепторов) в дистиллированной воде. Раствор фенибута представлял собой субстанцию с наполнителем, поэтому его вводили внутрибрюшинно в дозе 400 мг/кг. Морфин вводили внутривенно в дозе 10 мг/кг.

Минутный объем дыхания (МОД), частоту дыхания (ЧД) и пневмотахограмму регистрировали с помощью блока для измерения параметров дыхания на полиграфе МХ-01 (Россия) в условиях ВТРС. Системное артериальное давление (АД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) регистрировали посредством катетера, введенного в бедренную артерию и присоединенного к тензометрическому датчику давления МХ-01. Для регистрации внутрипищеводного давления в пищевод вводили катетер с эластичным баллончиком на конце, заполненным водой, который присоединяли к датчику низкого давления МХ-01. Давление в системе устанавливали таким образом, чтобы во время пассивного выдоха оно составляло 0 мм рт.ст. Все показатели регистрировали на чернильном самописце Н3031-6 (Россия). Полученные результаты обрабатывали статистически с помощью *t*-критерия Стьюдента, достоверным считали отличие при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В качестве контроля для сравнения была поставлена серия экспериментов, в которой двустороннюю ваготомию производили у крыс без каких-либо дополнительных воздействий (табл. 1). У таких животных пересечение блуждающих нервов приводило к первоначальному значительному (в 1,5—2 раза) снижению ЧД, которое компенсировалось одновременным углублением дыхательных движений, так что вентиляция легких практически не менялась. В дальнейшем, через 5—10 мин, начиналось восстановление прежнего характера дыхательных движений, и через 30 мин параметры дыхания возвращались к исходным значениям. Параметры системного кровообращения — частота сердечных сокращений и среднее артериальное давление практически не изменялись, проявляя лишь слабую тенденцию к повышению.

С целью определения влияния активации опиоидергической системы на передачу механорецепторной афферентации от рецепторов дыхательных путей и

Таблица 1

Показатели внешнего дыхания у крыс после двусторонней ваготомии в контрольных условиях ( $n = 15$ ) ( $M \pm m$ )

Показатель	Время после ваготомии, мин						
	0	1	3	5	10	15	30
МОД, мл/мин	21,5 ± 0,9	23,8 ± 1,2	20,8 ± 1,1	20,5 ± 1,0	21,2 ± 1,1	22,0 ± 1,1	24,3 ± 1,0
ЧД, мин <sup>-1</sup>	66,0 ± 2,0	41,2 ± 2,1 $p < 0,001$	54,0 ± 3,2 $p < 0,01$	58,2 ± 3,0 $p < 0,05$	62,3 ± 2,7	62,7 ± 2,5	64,5 ± 1,8
ДО, мл	0,33 ± 0,02	0,62 ± 0,05 $p < 0,001$	0,42 ± 0,05	0,38 ± 0,04	0,36 ± 0,03	0,36 ± 0,03	0,38 ± 0,02

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 указана достоверность изменений параметра после двусторонней ваготомии по сравнению с исходной величиной. Обозначения: МОД (минутный объем дыхания — показатель вентиляции легких); ЧД (частота дыхания); ДО (дыхательный объем — глубина дыхательных движений).

легких к дыхательному центру, производили двустороннюю ваготомию через 30 мин после введения морфина. Морфин угнетал вентиляцию легких — величина МОД снижалась в среднем на 30%, однако явных нарушений дыхательного ритма при данной дозе морфин не вызывал. Так же, как и у контрольных животных, наблюдали резкое снижение ЧД сразу после перерезки блуждающих нервов, а затем возникали хорошо выраженные нарушения дыхательного ритма в виде периодического апнейстического дыхания с задержками на вдохе. Несмотря на столь значительное (в 2 раза, см. табл. 2) снижение ЧД, легочная вентиляция (МОД) уменьшалась незначительно, благодаря существенному (в 2 раза и более, см. табл. 2) увеличению глубины дыхания (ДО). Такой периодический апнейстический тип дыхания поддерживался в течение 30 — 40 мин, постепенно задержки дыхания становились реже и короче по времени. Однако ЧД не восстанавливалась до исходных значений, в отличие от ваготомии в контрольных условиях. Необходимо отметить, что подобный тип периодического дыхания развивался только при высокой исходной ЧД. Если же частота дыхания у животного снижалась при введении морфина и перед ваготомией она была низкой, то в ответ на перерезку блуждающих нервов в таких условиях ни ЧД, ни МОД существенно не уменьшались, не происходило также нарушений дыхательного ритма.

Заметных изменений параметров системной гемодинамики при ваготомии на фоне введения морфина не происходило: к 15-й минуте частота сердечных сокращений и среднее артериальное давление проявляли

слабую тенденцию к снижению. Можно отметить также ритмичные снижения АД во время каждой остановки дыхания при периодическом апнейстическом дыхании. Однако все изменения параметров системной гемодинамики не выходили за рамки нормы и, следовательно, не могли быть причиной отмеченных нарушений дыхания.

Для сравнения производили активацию ГАМКергической системы фенибутом. Через 20—30 мин после введения фенибута наблюдали изменение характера дыхания в виде удлинения продолжительности вдоха, однако вдох в этих условиях становился менее эффективным, потому что наряду с увеличением длительности инспирации не происходило увеличения глубины дыхания (см. ДО в табл. 3). В 90% случаев фенибут не вызывал нарушений самого дыхательного ритма, и лишь в 10% опытов возникало периодическое дыхание с задержками на вдохе, подобное отмеченному ранее на кошках [8]. Под влиянием этого препарата постепенно происходило замедление дыхательных движений, в дальнейшем постепенно уменьшались значения МОД и к 30-й мин объем вентиляции уменьшался почти на 30% ( $p < 0,01$ ). У всех животных через 30 мин фенибут вызывал существенное уменьшение ЧД (почти в 2 раза), глубина дыхания в этих условиях увеличивалась, и к 30-й мин значения ДО возрастали в 1,5 раза. Изменения параметров системного кровообращения в данных условиях не выходили за рамки критических и не могли служить причиной нарушения регуляции дыхания: к 15-й мин артериальное давление повышалось в среднем на 19% ( $p < 0,02$ ), а частота сердечных сокращений уве-

Таблица 2

Параметры внешнего дыхания после двусторонней ваготомии на фоне действия морфина (n = 19; M ± m)

Параметр	Время, мин						
	0	1	3	5	10	15	30
МОД мл/мин	20,1 ± 1,6	20,3 ± 1,9	21,4 ± 1,9	15,5 ± 1,4 $p < 0,05$	15,5 ± 1,4 $p < 0,05$	16,1 ± 1,5	16,6 ± 1,5
ЧД мин <sup>-1</sup>	60,0 ± 2,4	26,7 ± 2,3 $p < 0,001$	27,6 ± 2,3 $p < 0,001$	28,9 ± 2,2 $p < 0,001$	29,4 ± 2,1 $p < 0,001$	29,7 ± 2,0 $p < 0,001$	30,4 ± 1,6 $p < 0,001$
ДО мл	0,34 ± 0,026	0,83 ± 0,1 $p < 0,001$	0,82 ± 0,09 $p < 0,001$	0,57 ± 0,07 $p < 0,01$	0,56 ± 0,06 $p < 0,01$	0,57 ± 0,07 $p < 0,01$	0,56 ± 0,06 $p < 0,002$

Примечание. Обозначения см. в табл. 1.

Таблица 3

Параметры внешнего дыхания после двусторонней ваготомии на фоне действия фенибута (n = 10; M ± m)

Параметр	Время, мин						
	0	1	3	5	10	15	30
МОД мл/мин	13,5 ± 1,3	13,7 ± 1,4	14,3 ± 2,2	13,2 ± 1,0	12,7 ± 2,0	11,8 ± 1,5	11,0 ± 1,8
ЧД мин <sup>-1</sup>	22,1 ± 2,1	19,2 ± 2,0	18,8 ± 1,7	19,4 ± 0,5	20,1 ± 1,8	19,2 ± 1,9	20,1 ± 2,3
ДО мл	0,76 ± 0,06	0,78 ± 0,06	0,81 ± 0,06	0,78 ± 0,06	0,75 ± 0,07	0,71 ± 0,08	0,63 ± 0,07

личивалась на 8% ( $p < 0,05$ ). Таким образом, изменения внешнего дыхания свидетельствуют о том, что фенибут вызывает глубокие нарушения регуляции дыхания и оказывает заметное влияние на работу генератора дыхательного ритма.

Для оценки степени влияния механорецепторного контура на регуляцию дыхания производили двустороннюю ваготомию через 30—45 мин после активации ГАМКергической системы фенибутом. В табл. 3 представлена динамика параметров дыхания после двусторонней ваготомии на фоне действия фенибута. Данные показывают, что ваготомия, проведенная при активации ГАМК-рецепторов не приводит к существенным изменениям показателей дыхания. Наиболее важным является почти полное отсутствие изменений частоты дыхательных движений, что резко отличает реакцию животных с активированной ГАМКергической системой от контрольных и находящихся под воздействием опиоидов.

Полученные данные позволяют предположить, что у крыс при стимуляции ГАМК-рецепторов фенибутом происходит почти полная потеря чувствительности дыхательной системы к ваготомии. По-видимому, активация ГАМКергической системы блокирует передачу афферентной импульсации от механорецепторов дыхательных путей и легких к нейронам центрального регулятора дыхания, то есть возникает эффект «центральной ваготомии». По-видимому, ГАМК-ергическая система, в отличие от опиоидергической, более активно участвует в механизме передачи механорецепторной афферентации от дыхательных путей и легких к дыхательному центру.

Можно также предположить, что выраженность нарушений дыхательного ритма, возникающих после введения тормозного медиатора, зависит от степени его влияния на работу механорецепторного контура

регуляции дыхания. Чем сильнее медиатор блокирует функцию механорецепторного контура, тем более значительные нарушения паттерна дыхания возникают в организме. Подобной зависимости не было нами выявлено в экспериментах по изучению влияния тормозных медиаторов на работу хеморецепторного контура регуляции дыхания [9].

## References

1. Bianchi A.L., Denavit-Saubie M., Champagnat J. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters *Physiol. Rev.* 1995; 75(1): 1-45.
2. Breslav I.S., Glebovskiy V.D. *Regulation of breathing [Regulyatsiya dykhaniya]*. Leningrad; 1981. (in Russian)
3. Safonov V.A., Efimov V.N., Chumachenko A.A. *Neyrofiziologiya dykhaniya*. Moscow: Meditsina; 1980. (in Russian)
4. Kukushkin M.L., Igon'kina S.I. Significance of GABA in the pain syndrome pathogenesis. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2014; 1: 68-78. (in Russian)
5. Tarakanov I.A., Safonov V.A. Neurohumoral concept of central respiratory regulation. *Patogenez*. 2003; 2: 11-24. (in Russian)
6. Tarakanov I.A., Safonov V.A. GABAergic system and its importance for the respiratory regulation. *Fiziologiya Cheloveka*. 1998; 24 (5): 116-28. (in Russian)
7. Safonov V.A. *The man in the ocean air [Chelovek v vozdyshnom okeane]*. Moscow: «Natsional'noe obozrenie»; 2006. (in Russian)
8. Tarakanov I.A., Safonov V.A. Effect of phenibut on the respiratory rhythm formation; *Bulleten Eksperimentalnoy Biologii i meditsiny*. 1995; 6: 606-9. (in Russian)
9. Tarakanov I.A., Tikhomirova L.N., Safonov V.A. Significance of opioidergic and GABAergic systems in the regulation of respiratory chemosensitivity to carbon dioxide in rats. *Patogenez*. 2012; 10 (1): 67-9. (in Russian)

Поступила 20.10.15

## Сведения об авторах:

Сафина Наиля Фаиковна (Safina N.F.), доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаб. общей патологии кардиореспираторной системы;

Тихомирова Людмила Николаевна (Tikhomirova L.N.), канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей патологии кардиореспираторной системы.

Волков Е.Е.<sup>1</sup>, Извольская М.С.<sup>2</sup>, Воронова С.Н.<sup>2</sup>, Василенко А.М.<sup>3</sup>, Волков А.Е.<sup>1</sup>

## **Новая фитотерапевтическая композиция для восстановления костной и хрящевой тканей. Экспериментальное исследование**

<sup>1</sup> — Клиника преморбидных и неотложных состояний ФКУ «МУНКЦ» им. П.В. Мандрыка МО РФ, 121002, Москва, Серебряный переулочек, д. 4

<sup>2</sup> — ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, д. 26

<sup>3</sup> — ФГБУ «Российский научный центр медицинской реабилитации и курортологии» Минздрава России, 1211099, Москва, ул. Новый Арбат, д. 32

*Представлена новая импортозаменяющая композиция смеси порошков лекарственных растений и пчелиного подмора. В преднизолоновой модели остеопороза показаны дозозависимые восстановительные эффекты костной и хрящевой тканей тазобедренных суставов мышей. Нежелательных побочных эффектов при приеме композиции не наблюдалось. Предполагается возможность эффективного применения разработанной композиции в качестве комPLEMENTАРНОГО средства лечения остеопороза.*

**Ключевые слова:** остеопороз, комPLEMENTАРНАЯ медицина, натуропатия, фитотерапия.

**Для цитирования:** Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015; 59(4): 30-34.

Volkov E.E.<sup>1</sup>, Izvolskaya M.S.<sup>2</sup>, Voronova S.N.<sup>2</sup>, Vasilenko A.M.<sup>3</sup>, Volkov A.E.<sup>1</sup>

## **New phytotherapeutic composition for restoring bone and cartilage. Experimental study**

<sup>1</sup> — Clinic pre-morbid and emergency conditions FКУ «MONKS» them P.V. Mandryka 121002, Moscow, Silver lane, 4

<sup>2</sup> — Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Vavilov St. 26

<sup>3</sup> — Federal state budgetary institution «Russian Research Centre of Medical Rehabilitation and Balneology» Russian Ministry of Health, 121099, Moscow, New Arbat St. 32

*Presents a new import-substituting the composition of the powder mixture 60 medicinal plants and dead bees. In prednisolone models of osteoporosis have shown dose-dependent regenerative effects bone and cartilage of the hip joints of mice. Unwanted side effects when taking composition was observed. It is assumed the possibility of effective application of the composition as a complementary treatment for osteoporosis.*

**Key words:** osteoporosis, complementary medicine, naturopathy, herbal medicine.

**For citation:** *Patologicheskaya Fiziologiya I eksperimentalnaya terapiya.* 2015; 59(4): 30-34.

**For correspondence:** Vasilenko A.M., e-mail: vasilenko-a-m@mail.ru

Остеопороз входит в число наиболее актуальных проблем современного здравоохранения. 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 [1]. В России остеопорозом страдают 14 млн чел. (10% населения страны) старше 50 лет. Еще у 20 млн обнаруживается остеопения [2, 3]. Остеопороз занимает четвертое место по частоте инвалидизации после болезней сердечно-сосудистой

системы, сахарного диабета и онкологических заболеваний.

Предложено множество средств и методов лечения и профилактики остеопороза [1, 2, 4]. Однако оптимистические ожидания, связанные с широким внедрением в практику множества препаратов для его лечения оправдываются не в полной мере. Это обусловлено высоким уровнем лекарственных ятрогений [5], высокой ценой и недостаточной эффективностью препаратов. Поэтому поиск комPLEMENTАРНЫХ подходов к коррекции костного метаболизма, в том числе в арсенале натуропатических средств, остаётся актуальным.

Некоторые компоненты растительного и животного происхождения входят в состав широко известных препаратов, рекомендуемых при остеопорозе. Например, основными действующими компонентами препарата «СустаВит» являются сульфат глюкозамина, получаемый из экзоскелетов ракообразных, бромелайн выделяемый из плодов ананаса, босвеллин из смолы босвеллии (*Boswellia serrata*) и куркумин из корня куркумы (*Curcuma longa*). Лечебно-профилактическая композиция «Остеомакс Экстра» для улучшения функционального состояния опорно-двигательного аппарата включает белково-гликозидный комплекс из голотурии, экстракты корня лопуха и коры осины. Из патента US 20041211024 A1 (24.06.2004), известна композиция для лечения и предупреждения остеоартрита, ревматоидных артритов и подобных болезней, содержащая экстракт крапивы и кверцетин.

Запатентована и композиция, содержащая значительно большее количество компонентов [6].

Как правило, натуропатические средства растительного и животного происхождения применяются в комплексе с лечебной физкультурой и разнообразными физиотерапевтическими методами. В настоящее время активно применяется разработанный профессором Хуан Кэ-Цинем комплексный метод лечения [7]. Метод включает динамично изменяющуюся схему электропунктуры через аппликаторы из лекарственных трав (фито-электропунктура), лечебную гимнастику, использование костылей, фитованны и массажи по индивидуальным программам. В процессе внедрения в российское здравоохранение, оригинальный метод профессора Хуан Кэ-цзиня, сохранив основные свои позиции, подвергся ряду изменений, касающихся его материального обеспечения, порядка обследования и лечения пациентов. В частности, первоначально использовались готовые импортные фильтр-пакеты фитосборов шэнгусань, хунбаосань и чжэньцисань производства Пекинской компании «Божань». С 2011 г. наладили полный цикл производства фильтр-пакетов, содержащих сборы из отечественного ареала аналогичные оригинальным китайским [8].

Обязательным компонентом оригинального метода лечения является регулярный приём препарата традиционной китайской медицины Чэнцзай, состоящего (по заявлению производителя) из 22 компонентов растительного и животного происхождения. Чэнцзай обладает поливалентным действием, в том числе, и на основные патогенетические механизмы остеопороза: усиливает тканевое кровообращение, оказывает цитопротективное и антиоксидантное действие, активирует регенеративные процессы, повышает минерализацию и плотность костной ткани [9]. Однако большинство входящих в него лечебных растений не рас-

тет на территории РФ, а технология приготовления этого препарата производителями не разглашается. Указанные обстоятельства послужили основанием для разработки отечественной фитотерапевтической композиции взамен импортируемому препарату Чэнцзай.

*Цель исследования:* разработать импортозамещающую натуропатическую композицию для комплексной помощи пациентам с остеопорозом и оценить её действие в эксперименте.

## Методика

Состав композиции определили путем изучения многочисленных фармакологических свойств водных извлечений более чем из 150 растений. Из них были выбраны те, которые оказывают наиболее выраженное влияние на отдельные звенья патогенезов остеопороза и асептического некроза и характеризующиеся полипотентным действием. В композицию были отобраны растения, обладающие следующими свойствами<sup>1</sup>.

1. Противовоспалительные: береза, вероника, мята длинолистная, мята перечная, мокрица, солодка, ива, шалфей, черника, осина, ромашка, сenna, крушина, череда, володушка, душица, зюзник, иван-чай, иссоп, мелисса, пион, полынь, ряска, синеголовник, лабазник, чабрец.

2. Гепатопротективные: осина, подорожник, володушка, дягель, золототысячник, зубчатка, люцерна, полынь, репешок, астрагал, солодка.

3. Иммуномодулирующие: солодка, подорожник, володушка, дрок, дурнишник, дягель, зубчатка, иссоп, красный корень, красная щетка, люцерна, медуница, полынь, репешок, синеголовник, смородина, лабазник, чабрец, эхинацея.

4. Регенеративные: солодка, горец птичий, подорожник, сушеница, герань кроваво-красная, герань луговая, герань лесная, дурнишник, золотая розга, люцерна, манжетка, мокрица, пикульник, подмаренник, смородина, сныть, астрагал.

5. Корректирующие функции эндокринных желез (гипофиза, надпочечников, щитовидной железы, половых желез): солодка, шалфей, ежевика, подорожник, дрок, дурнишник, зубчатка, зюзник, красный корень, красная щетка, люцерна, манжетка, смородина, сурепка, лабазник, чернобильник, эхинацея, астрагал.

<sup>1</sup> Волков А.Е., Волков Е.Е., Гордеев М.В., Гордеева Ю.М. Композиция для восстановления хрящевой и костной ткани при остеопорозе. Заявка на изобретение № 2015120494 от 01.06.2015 (входящий номер 031753).

6. Вазопротектирующие: горец перечный, горец птичий, сушеница, посконник, астрагал.

7. Стресс-лимитирующие: мята длиннолистная, мята перечная, ромашка, сушеница, душица, дягиль, зюзник, иван-чай, красный корень, красная щетка, Melissa, манжетка, мокрица, пион, первоцвет, посконник, пустырник, синеголовник, лабазник, чабрец, чернобыльник.

8. Минералорегулирующие: солодка, горец птичий, череда, герань кроваво-красная, герань луговая, герань лесная, дурнишник, люцерна, пикульник, подмаренник, сныть, смородина.

9. Улучшающие мозговое кровообращение: астрагал, первоцвет, герань, вероника, мята, смородина, посконник, очанка.

Из средств животного происхождения был выбран подмор пчёл, действующим началом которого является пчело(апи)зан — более мощный полипотентный биологический регулятор, чем хитозан ракообразных.

Экспериментальные исследования эффективности заявленной композиции проведены на самцах и самках мышей линии Balb/c 2-месячного возраста массой 20 г (Питомник Столбовая, РАН). Мышей содержали в стандартных условиях по 5 особей в клетке с контролируемыми режимами температуры ( $24^{\circ}\text{C}$ ) и освещения (в течение 12 ч) и со свободным доступом к воде и пище. Для моделирования экспериментального остеопороза использовали синтетический глюкокортикоид преднизолон, который вводили в/м мышам в дозе 1 мг/мышь в течение 14 сут. Доза вводимого преднизолона была выбрана на основе данных литературы [10].

Все животные были разделены на 6 групп по 10 мышей в каждой (5 самок + 5 самцов). 1 — контрольная группа — интактные мыши. Животным остальных пяти групп вводили преднизолон. Животных 2-й группы забивали с помощью цервикальной дислокации через 14 сут. после 14-сут. введения преднизолона. Извлекали бедренные кости, которые использовали для гистологического анализа и морфологической оценки исходной выраженности патологического процесса. Животные 3-й группы после 14-сут. введения преднизолона в течение 30 сут. ежедневно получали порции каши, служившей основой для скормливания заявленного средства. Животные с 4 по 6-ю группу в те же сроки получали кашу с заявленным средством в разных дозах: 5,0, 50 и 250 мг/мышь. По окончании курса приема заявленного средства проводили гистологический анализ бедренных костей.

Кости мышей всех шести групп фиксировали в 10% формалине, приготовленном на фосфатно-солевом буфере (ФСБ, 0,02М, рН 7.6) 24 ч при ком-

натной температуре. Декальцинировали в 5% трихлоруксусной кислоте 24—48 часов, затем промывали в ФСБ и замораживали в изопентане при  $-40^{\circ}\text{C}$ . Далее приготавливали срезы толщиной 10 мкм на криостате Leica (Германия). Срезы высушивали при комнатной температуре в течение 1 часа и окрашивали гематоксилин-эозином с последующим анализом изображения с помощью светового микроскопа Olympus Vanox AH BT3 (Германия), увеличение ( $\times 100$ ) или ( $\times 200$ ). Изображения фотографировали и в поле зрения проводили морфологический анализ клеток. Для определения достоверности различий между опытом и контролем использовали непараметрический двусторонний критерий Манна—Уитни (U-тест).

## Результаты и обсуждение

Анализ гистологических данных показал, что 14-сут. введение преднизолона вызывает выраженные изменения как хрящевой ткани головок бедренных костей мышей, так и непосредственно костной ткани (рис. 1, 2). Как видно из рис. 1,Б, под действием преднизолона значительно усиливается пролиферативная активность хондроцитов ( $112 \pm 7$ ) по сравнению с контрольной группой животных, не получавших инъекции преднизолона ( $12 \pm 4$ , рис. 1,А достоверность различия между опытной и контрольной группами:  $M \pm SEM$ ;  $p < 0,05$ ). Особенностью суставного хряща, по сравнению с другими видами тканей в организме является наличие небольшого количества клеток, окруженных большой площадью межклеточного пространства — матриком, представленным коллагеновыми волокнами и основным веществом. Увеличение числа хондроцитов происходит за счет внеклеточного матрикса, что приводит в дальнейшем к их качественным изменениям.

По истечении 30 сут. в 3-й группе животных, получавших кашу без заявленной композиции, количество хондроцитов незначительно снижалось ( $83 \pm 6$ , рис. 1,В) по сравнению со 2-й группой животных, забитых через 14 сут. после введения преднизолона. Заявленная композиция, принимаемая в дозе 5,0 мг/мышь, оказывала слабо выраженный корригирующий эффект на хрящевую ткань (число хондроцитов составляло  $52 \pm 6$ , рис. 1,Г). Восстановление гиалинового хряща практически до нормы наблюдалось при приеме композиции в дозах 50 и 250 мг/мышь ( $8 \pm 3$  и  $20 \pm 7$  соответственно, рис. 1,Д,Е). Достоверность различий между опытной (5 и 6-й) и контрольной (2-й) группами:  $M \pm SEM$ ;  $p < 0,05$ .) и были одинаковыми у самцов и самок.



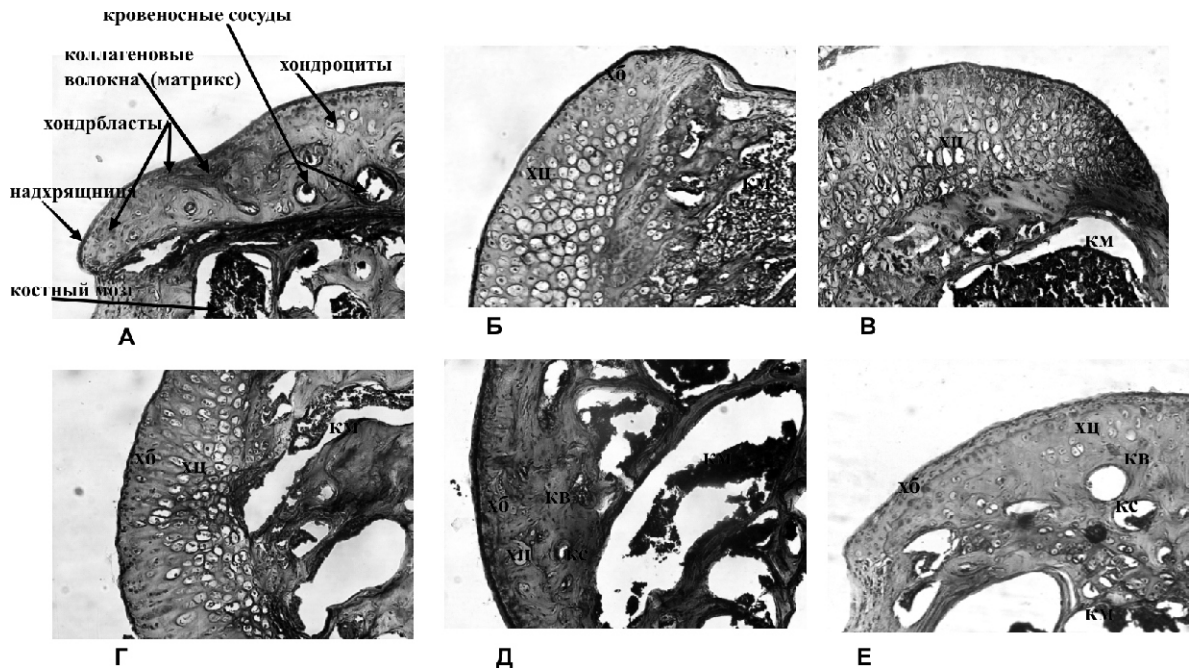


Рис. 1. Срезы головок бедренных костей у контрольных животных (А — интактные), (Б — после в/м введения преднизолона в дозе 1 мг/мышь через 14 и (В) через 30 дней) и после приема композиции в течение 30 дней в дозах 5 мг/мышь (Г), 50 мг/мышь (Д), 250 мг/мышь. Окраска гематоксилин-эозином. Обозначения: хц — хондроциты, хб — хондробласты, кс — кровеносные сосуды, кв — коллагеновые волокна, км — костный мозг. Увеличение: объектив x 10, окуляр 10. Число животных в каждой группе n = 10.

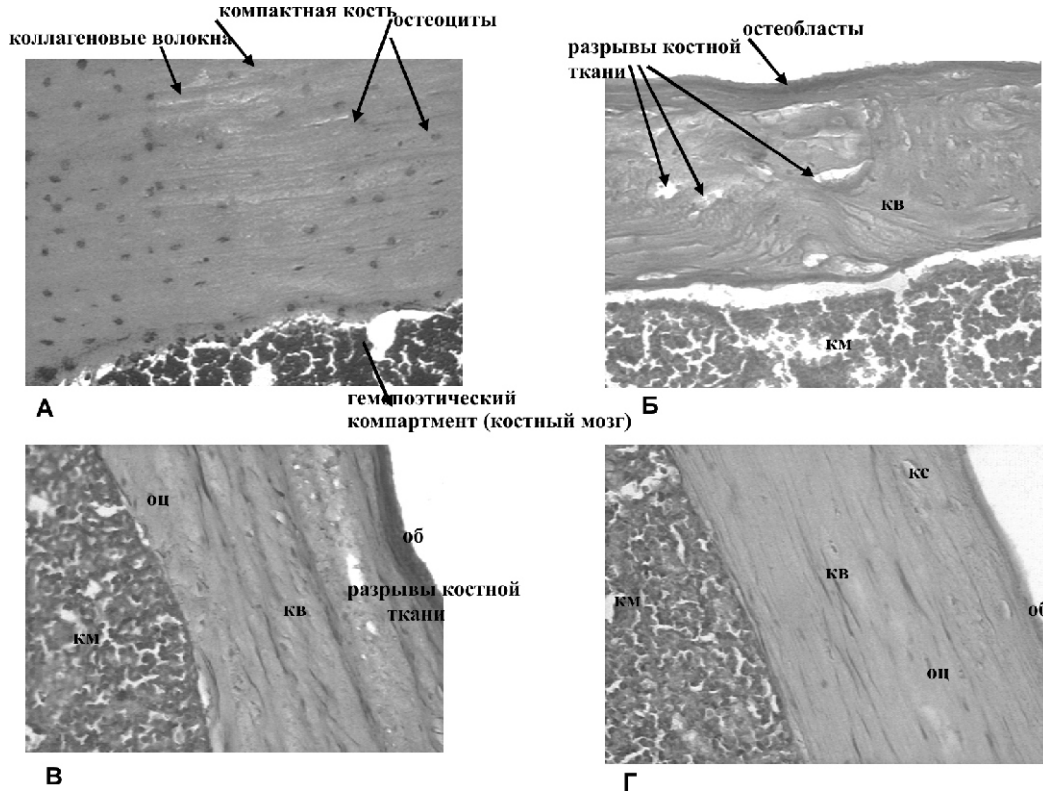


Рис. 2. Срезы бедренных костей у контрольных животных (А — интактные, Б — после в/м введения преднизолона в дозе 1 мг/мышь через 14 и (В) 30 дней) и (Г) после приема композиции в течение 30 дней в дозе 250 мг/мышь. Окраска гематоксилин-эозином. Обозначения: оц — остеоциты, об — остеобласты, кс — кровеносные сосуды, кв — коллагеновые волокна, км — костный мозг. Увеличение: объектив x 20, окуляр 10. Число животных в каждой группе n = 10.

## References

Заявленная композиция в дозе 250 мг/мышь оказывала корригирующий эффект также и на костную ткань (рис. 2). Под её действием наблюдалось восстановление костной ткани до показателей контрольных животных (рис. 2,А,Г). Через 14 сут. после введения преднизолона в костной ткани были выявлены многочисленные участки разрывов (рис. 2Б), которые не исчезали и через 30 сут. после инъекции (рис. 2,В). Кроме того, через 14 сут. после введения преднизолона в костной ткани была выявлена хаотичная ориентация коллагеновых волокон (рис. 2,Б), тогда как после приема композиции их расположение было подобно расположению у контрольных интактных животных (рис. 2,А).

Эффективность заявленной композиции обнаруживалась также по различиям внешнего вида и поведения мышей в основных группах животных по сравнению с мышами 3-й группы, не принимавших препарат. Нежелательных побочных эффектов при приеме композиции не наблюдалось.

## Вывод

Полученные данные свидетельствуют о перспективности применения разработанной фитотерапевтической композиции в качестве комPLEMENTАРНОГО средства лечения остеопороза.

1. Rudenko Je.V., Buglova A.E., Rudenko E.V., Samohov O.Ju. *Drug treatment of osteoporosis in adults Uchebno-metodicheskoe posobie*. Minsk: BelMAPO, 2011; 22. (in Russian).
2. Mihajlov E.E., Benevolenskaja L.I. *Guide to osteoporosis*. Ed. M: BINOM 2003;10-55. (in Russian)
3. Lesnjak O.M. Osteoporosis audit in the Russian Federation. *Profilakticheskaja medicina*/ 2011; 2: 7-10. (in Russian)
4. *Osteoporosis Under the editorship O.M Lesnjak, L.I. Benevolenskaja*. 2-e izd., pererab. i dop. (Serija «Klinicheskie rekomendacii») Moscow; GJeOTAR-Media, 2010; 272. (in Russian)
5. Sychjov D.A. How to avoid farmageddon? *Refleksoterapija i komplementarnaja medicina*. 2015; 2(12): 5-11. (in Russian)
6. Trifonov V.N., Elistratova Ju.A., Elistratov K.G., Kurus' N.V., Homjakova I.V., Elistratova T.V. Composition for the treatment and prevention of osteoarthritis, osteoporosis and osteoarthritis joints. *Patent RF № 2521227*. zavavka: 2013-03-28, publikacija patenta: 27.06.2014. (in Russian)
7. Lang FP, Huang H, Huang H, Huang KQ, Zhang JC. Retrospective analysis of therapeutic efficacy in 1 425 cases of femoral head necrosis. *Zhonggou Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu* 2008; 12(33): 6500-4 (China).
8. Volkov E.E. A possible alternative to hip replacement in avascular necrosis of the femoral head. *Refleksoterapija i komplementarnaja medicina*. 2013; 3(5): 26-34. (in Russian)
9. Chen Y, Huang K, Lang F, et al. Experimental study on cheng zai wan for treatment of necrosis of the femoral head. *J Tradit Chin Med*. 2003; 23 (4): 292-8.
10. Valeeva I.E., Ziganshina L.E., Burnashova Z.A., Ziganshin A.U. Dimephosphon and xydiphone influence the lipid peroxidation indices and antioxidant system characteristics in rats upon prolonged chronic administration of prednisolone. *Jeksperimental'naja i klinicheskaja farmakologija*. 2002; 65(2): 40-3. (in Russian)

Поступила 02.11.15

**Участие авторов:** Е.Волков — составление композиции, М.Извольская, С.Воронова — экспериментальное исследование, А.Василенко — дизайн исследования и написание статьи.

## Сведения об авторах:

Извольская Марина Сергеевна, науч. сотр., ФГБНУ «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова», канд. биол. наук

Воронова Светлана Николаевна, канд. биол. наук, науч. сотр., ФГБНУ «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова»

Волков Андрей Евгеньевич, сотр. ООО «Медицинский центр ХуанДи»

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

Елистратова И.В.<sup>1</sup>, Морозов С.Г.<sup>2</sup>, Захарова И.А.<sup>2</sup>, Тарасова М.В.<sup>2</sup>

## **Люминол-зависимая хемилюминесценция лейкоцитов периферической крови больных атопическим дерматитом при различной тяжести течения заболевания**

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

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

*Целью работы было изучение спонтанной и индуцированной люминол — зависимой хемилюминесценции лейкоцитарных клеток крови больных атопическим дерматитом.*

***Методы.** Кровь получали из локтевой вены, эритроциты удаляли, лейкоцитарную взвесь анализировали на люминографе. Опсонизированный зимозан и дрожжи *Candida tropicalis* были использованы для индукции хемилюминесценции лейкоцитов.*

***Результаты.** При легкой степени тяжести атопического дерматита спонтанная и индуцированная хемилюминесценция лейкоцитов периферической крови больных была повышена, статистически достоверная разница показана между группами больных легкой и тяжелой степенью атопического дерматита, при которой изучаемые показатели достоверно были снижены. Контаминация кожи *Candida tropicalis* способствовала повышению уровня хемилюминесценции лейкоцитов крови при легкой степени тяжести атопического дерматита в первую неделю обострения. Тяжелая степень атопического дерматита сопряжена с подавлением как спонтанной, так и индуцированной хемилюминесценции.*

***Выводы.** Люминол-зависимая хемилюминесценция лейкоцитов крови взрослых больных атопическим дерматитом может быть повышена на ранних стадиях обострения при легкой степени заболевания, но достоверно подавлена при тяжелом течении атопического дерматита.*

***Ключевые слова:** атопический дерматит, хемилюминесценция, зимозан, *Candida tropicalis*.*

***Для цитирования:** Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015; 59(4): 35-40.*

Elistratova I.V.<sup>1</sup>, Morozov S.G.<sup>2</sup>, Zakharova I.A.<sup>2</sup>, Tarasova M.V.<sup>2</sup>

## **Peripheral blood cells luminol-dependent chemiluminescence at the different stages of atopic dermatitis**

<sup>1</sup> — The main military clinical hospital of internal troops of the MIA of Russia, 143930, Balashikha, Nikolo-Archangel, St. Vishnyakovskaya, 101

<sup>2</sup> — Research Institute General pathology and pathophysiology», 125315, Moscow, Russia, Baltiyskaya st., 8

*Aim of this work was to record the luminol-dependent spontaneous and induced chemiluminescence at the different stages of atopic dermatitis.*

***Methods.** Peripheral blood cells were obtained from adult patient with atopic dermatitis followed by the registration of luminol-dependent chemiluminescence on luminograph. Opsonized zymosan as well as yeasts *Candida tropicalis* have been used to induce the chemiluminescence.*

***Results.** Spontaneous and induced chemiluminescence were slightly elevated at the mild atopic dermatitis but were decreased at the severe stage of disease. Statistically significant difference has been found between group with mild and severe atopic dermatitis, Skin contamination by yeasts *Candida tropicalis* causes the increased level of blood cells chemiluminescence at the first week of atopic relapse when the disease was mild. Severe stage of atopic dermatitis was coupled with statistically significant inhibition of both, spontaneous and induced chemiluminescence.*

***Conclusions.** Luminol-dependent chemiluminescence of peripheral blood cells from adult atopic dermatitis patients may be stimulated at the mild stage and suppressed at severe stage of atopic dermatitis.*

***Key words:** atopic dermatitis, chemiluminescence, zymosan, *Candida tropicalis*.*

***For citation:** Patologicheskaya Fiziologiya I eksperimentalnaya terapiya. 2015; 59(4): 35-40.*

***For correspondence:** Morozov S.G., e-mail: biopharm@list.ru*

*Для корреспонденции:* Морозов Сергей Георгиевич, доктор мед. наук, проф., член-корреспондент РАН, зам. директора по науке ФГБНУ «НИИОПП», e-mail: biopharm@list.ru

Полиморфноядерные гранулоциты (нейтрофилы) — это первые клетки, которые мигрируют в очаг воспаления в ответ на бактериальные или иные инфекционные стимулы. Помимо фагоцитарной активности, синтеза антимикробных пептидов, нейтрофилы также высвобождают в ткани реактивные метаболиты кислорода (Reactive Oxygen Species — ROS) и протеолитические ферменты. При накоплении нейтрофилов в тканях и нарушении программы апоптоза, высвобождаемые ими цитокины и ROS могут вызвать повреждение клеток и поддерживать воспалительный процесс в экстраклеточном пространстве [1]. Число нейтрофилов в коже больных атопическим дерматитом не меньше, чем у больных псориазом [2]. По другим данным, при атопическом дерматите ослаблен приток нейтрофилов в ткани [3].

В отношении функциональной активности нейтрофилов периферической крови при атопическом дерматите данные разных авторов противоречивы. По некоторым данным, у больных атопическим дерматитом снижена фагоцитарная активность, при этом повышена экспрессия рецепторов CD11b, CD66b, TLR2, TLR4, TLR5 по сравнению со здоровыми лицами [4]. У больных атопическим дерматитом средней степени тяжести и тяжелого течения показано существенное снижение фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови, а также ослабление хемотаксической активности в ответ на зимозан [5]. По другим данным, у больных атопическим дерматитом функциональная активность нейтрофилов в ответ на рецептор-зависимые стимулы (fmlr, C5a, LTB4, опсонизированный зимозан) сопоставима с данными здоровых людей. Моноциты больных атопическим дерматитом отвечали повышенной продукцией супероксидного аниона после стимуляции зимозаном и небольшим повышением fmlr-индуцированного хемотаксиса. При высоком уровне контаминации бактериальной инфекцией хемотаксис нейтрофилов и моноцитов больных атопическим дерматитом был снижен в течение трех дней от начала заболевания. Генерация супероксидного аниона нейтрофилами при этом была снижена, а в моноцитах — повышена. Изменение функциональной активности нейтрофилов и моноцитов при атопическом дерматите связывают с наличием или отсутствием бактериальной инфекции. При нормальной фагоцитарной активности у больных они, как правило, не имели выраженной бактериальной контаминации. При дефиците хемотаксиса и фагоцитоза у больных были повторы выраженной бактериальной инфекции и поражения грибами или системная инфекция [6].

При атопическом дерматите клетки кожи в пораженных участках находятся в условиях высокой концентрации реактивных метаболитов кислорода.

Основной источник ROS внутри клеток — митохондриальное дыхание, нарушение которого при различных патологических состояниях приводит к изменению уровня супероксидного аниона. За «респираторный взрыв» ответственна NADPH оксидаза — мембранно-связанный ферментный комплекс, генерирующий супероксидный анион путем каталитического переноса электронов от NADPH на молекулярный кислород [7]. На нейтрофилах присутствует NADPH оксидаза-2. С-концевой домен NADPH оксидазы-1, -2, -3 и -5 связывает белок теплового шока HSP90, который необходим для стабилизации фермента и продукции супероксидного аниона. NADPH оксидаза-4 ответственна только за продукцию перекиси водорода, но не продуцирует супероксидный анион [8].

Для изучения функциональной активности нейтрофилов часто используют опсонизированный зимозан, который распознается экспрессированными вместе рецепторами FcγRIIa и FcγRIIb (CD32a и CD16b). CD32a — это трансмембранный белок, CD16b — GPI-заякоренный протеин, экспрессия которого на нейтрофилах в 10 раз превышает уровень экспрессии CD32a (135 000 vs 10 000 рецепторов на клетку). В состоянии покоя аффинность связывания этих рецепторов для Fc фрагмента мономерного IgG человека относительно низка, при активации их экспрессия повышается, а также возрастает аффинность связывания. Оба рецептора необходимы для адекватного ответа на IgG-зависимые стимулы и продукции супероксидного аниона нейтрофилами [9].

В связи с тем, что нет определенного понимания функции нейтрофилов при атопическом дерматите, мы поставили задачу изучить генерацию супероксидного аниона нейтрофильными клетками периферической крови больных атопическим дерматитом в зависимости от стадии заболевания и тяжести течения.

## Методика

### Пациенты и доноры

В работе представлены материалы обследования 146 пациентов с атопическим дерматитом (до лечения), в возрасте от 18 до 38 лет. Все пациенты и доноры подписывали форму информированного согласия. Критериями исключения пациентов из исследования служили:

- 1) наличие острых вирусных или бактериальных инфекций;
- 2) онкологические заболевания;
- 3) соматические заболевания, которые могли бы оказать дезинформирующее влияние на полученные результаты;

4) наличие системных аллергических или воспалительных заболеваний;

5) беременность;

5) невозможность постоянной работы с пациентом в связи с его психомоторным состоянием.

Тяжесть течения заболевания оценивали по индексу SCORAD. В настоящем исследовании представлены данные 32 здоровых доноров.

#### Выделение клеток крови

Работа с кровью людей проводилась по международным правилам работы с биологическим материалом. Кровь брали натошак из локтевой вены в вакутейнер с ЭДТА. Для получения лейкоцитарной взвеси кровь переносили в центрифужные пробирки, добавляли 15 мл лизирующей жидкости (коммерческий препарат фирмы Vecton Dickinson для удаления эритроцитов), затем центрифугировали 10 мин при 200g при комнатной температуре. Супернатант удаляли, осадок встряхивали, добавляли 199 среду и отмывали суспензию клеток центрифугированием.

#### Люминол-зависимая хемилюминесценция

Суспензию клеток доводили до концентрации  $1 \times 10^6$  клеток в 100 мкл фосфатного буфера с люминолом. По 100 мкл суспензии переносили в пробирки люминографа и термостатировали при  $37^\circ\text{C}$ . Для каждого больного ставили по три параллельные пробирки. Динамику хемилюминесценции измеряли на автоматизированном 36-канальном хемилюминографе «Люцифер-Б» (Диалог, Москва). Спонтанную хемилюминесценцию определяли до выхода кривой числа импульсов на плато ( $10 \pm 2$  мин). Затем добавляли 5 мкл 1% раствора опсонизированного зимозана (или другого активатора) и в течение 40 мин измеряли индуцированную хемилюминесценцию. В качестве индуктора хемилюминесценции также использовали дрожжи *Candida tropicalis* (20 мкл раствора дрожжей по  $50 \times 10^3$  клеток на пробу). Схема проведения измерений представлена на рисунке. Результаты определяли по максимальным значениям кинетической кривой и выражали в виде среднего числа импульсов в минуту на 100 мкл клеток, а также в пересчете на  $1 \times 10^6$  клеток по сумме трех измерений на каждую пробу.

#### Статистический анализ

Все эксперименты проводились в повторах, полученные данные представлены как  $M \pm m$ . Данные анализировались по программе ANOVA. Сравнение между двумя группами проводили по критерию Стьюдента, статистический анализ нескольких групп проводился с помощью непараметрического анализа

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

### Результаты и обсуждение

Полученные данные по спонтанной и индуцированной хемилюминесценции лейкоцитарной взвеси периферической крови проанализированы в зависимости от тяжести течения атопического дерматита (по индексу SCORAD) (табл. 1) и распространенности процесса (табл. 2).

Полученное повышение спонтанной и индуцированной хемилюминесценции при легкой степени тяжести атопического дерматита и ограниченной локализации процесса по сравнению со здоровыми донорами не является статистически достоверной. При сравнении результатов больных с тяжелым течением и легкой степенью имеется достоверное различие ( $P < 0,05$ ). Показано достоверное различие ( $P < 0,05$ ) между уровнем индуцированной зимозаном хемилюминесценции у больных ограниченно-локализованным и диффузным процессом.

Далее был проведен анализ полученных результатов в зависимости от длительности течения настоящего обострения. Среди тех больных, которые обратились в поликлинику в течение первой недели текущего обострения (с первого по шестой день включительно) ( $n = 74$ ), выделена группа лиц, у которых имелась лабораторно подтвержденная контаминация бактериальной или грибковой инфекцией. Анализ данных по этим группам больным проведен раздельно. Для этих выделенных групп больных были подобраны доноры соответствующего возраста. При контаминации кожи условно-патогенными дрожжами рода *Candida tropicalis* ( $n = 18$ ) показана более высокая спонтанная хемилюминесценция по сравнению со

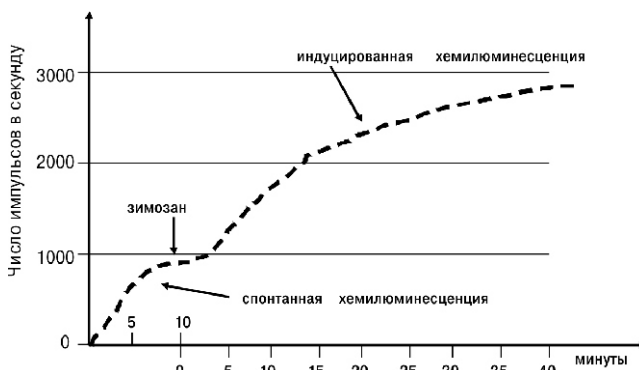


Схема проведения измерений люминол-зависимой хемилюминесценции.

средними показателями для общей группы больных. У двух больных с тяжелым течением была смешанная контаминация дрожжами и бактериальной инфекцией, при этом спонтанная хемилюминесценция была достоверно снижена по сравнению со здоровыми донорами и по сравнению с легкой степенью ( $P < 0,05$ ). Индуцированная зимозаном хемилюминесценция была повышена (недостоверно) при легкой степени тяжести заболевания по сравнению с донорами, но достоверно повышена по сравнению с тяжелой формой заболевания ( $P < 0,05$ ) (табл. 3). Неожиданным оказался высокий ответ на стимуляцию клеток крови добавлением взвеси дрожжей *Candida tropicalis*. Дрожжи *Candida tropicalis* являются условно патогенными,

однако, при наличии сопутствующего нарушения иммунитета или тяжелой соматической патологии, их присутствие на коже человека имеет выраженный патологический характер. Высокий уровень ответа на стимуляцию дрожжами *Candida tropicalis ex vivo*, скорее всего, можно объяснить различием в линейной специфичности внутри одного рода. То есть контаминация больных могла быть дрожжами не идентичной принадлежности.

Среди больных, обратившихся в первую неделю обострения, у которых подтверждена контаминация кожи бактериями ( $n = 42$ ), выделена группа лиц, контаминированных золотистым стафилококком ( $n = 20$ ). У трех больных с тяжелой формой атопиче-

Таблица 1

Хемилюминесценция (импульсы в секунду) на  $1 \times 10^6$  клеток крови доноров и больных атопическим дерматитом в зависимости от тяжести течения\*

	Доноры (n = 32)	Больные атопическим дерматитом. Классификация по индексу SCORAD		
		Легкое течение <20 (n = 48)	Средней тяжести 20 — 40 (n = 76)	Тяжелое течение 40 — 60 (n = 22)
Спонтанная хемилюминесценция	963 ± 71	1210 ± 141	982 ± 113	729 ± 122
Индуцированная хемилюминесценция				
Зимозан	3136 ± 244	3482 ± 201	3017 ± 324	2921 ± 306
<i>Candida tropicalis</i>	2905 ± 298	2988 ± 265	2794 ± 302	2521 ± 287

Примечание. \* Фон составил 300 импульсов в секунду

Таблица 2

Хемилюминесценция (импульсы в секунду) на  $1 \times 10^6$  клеток крови доноров и больных атопическим дерматитом в зависимости от площади поражения кожи\*

Хемилюминесценция	Доноры (n = 32)	Больные атопическим дерматитом. Типы распространённости процесса		
		Ограниченно-локализованный (n = 41)	Распространённый (n = 77)	Диффузный (n = 28)
Спонтанная	963 ± 71	1113 ± 134	950 ± 128	821 ± 136
Индуцированная				
Зимозан	3136 ± 244	3294 ± 222	2983 ± 265	2611 ± 362
<i>Candida tropicalis</i>	2905 ± 298	3008 ± 261	2865 ± 303	2617 ± 381

Примечание. \* Фон составил 300 импульсов в секунду

Таблица 3

Хемилюминесценция (импульсы в секунду) на  $1 \times 10^6$  клеток крови доноров и больных атопическим дерматитом, контаминированных дрожжами *Candida tropicalis*, при различной степени тяжести клинического течения в первую неделю обострения\*

	Доноры (n = 12)	Больные атопическим дерматитом. Классификация по индексу SCORAD		
		Легкое течение <20 (n = 7)	Средней тяжести 20 — 40 (n = 9)	Тяжелое течение 40 — 60 (n = 2)
Спонтанная хемилюминесценция	1202 ± 95	1351 ± 124	1196 ± 133	801 ± 57
Индуцированная хемилюминесценция				
Зимозан	3341 ± 195	3556 ± 201	3198 ± 227	2980 ± 166
<i>Candida tropicalis</i>	3220 ± 169	3301 ± 244	3012 ± 295	2891 ± 306

Примечание. \* Фон составил 300 импульсов в секунду

ского дерматита была микст-инфекция, у двух — сочетанное поражения грибами и бактериями. В этой группе больных имеется тенденция к снижению уровня хемилюминесценции по мере усиления тяжести заболевания. Индуцированная зимозаном хемилюминесценция клеток крови больных тяжелой формой атопического дерматита достоверно снижена ( $P < 0,05$ ) по сравнению с донорами и больными с легкой формой заболевания. Уровень хемилюминесценции, стимулированной дрожжами *Candida tropicalis*, ниже показателей для общего числа больных атопическим дерматитом, и достоверно ниже у больных с тяжелой формой атопического дерматита ( $P < 0,05$ ) по сравнению с донорами и с больными легкой формой заболевания (табл. 4). Таким образом, контаминация кожи бактериальной инфекцией при атопическом дерматите обуславливает снижение хемилюминесценции лейкоцитов, как спонтанной, так и индуцированной зимозаном или дрожжами рода *Candida tropicalis*.

По имеющимся данным литературы, у больных с тяжелой формой заболевания и бактериальной контаминацией показано снижение функциональной активности нейтрофилов, которое связано в некоторых случаях с нарушением рецепторного аппарата клеток. Рецепторы TLR4 распознают бактериальный липополисахарид Грам-отрицательных бактерий, а рецепторы TLR2 распознают Грам-положительные бактерии, бактериальные пептиды и дрожжи. Кроме того, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) повышает экспрессию рецепторов TLR2 и связывание их с лигандами. Поэтому дефицит GM-CSF также может вызывать нарушение антибактериальной функции нейтрофилов. Наиболее клинически значимыми контаминантами кожи при атопическом дерматите являются: *Malassezia spp.*, *Candida spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Dematiophagoides pteronyssinus* [10]. Однако, по нашим данным, контаминация кожи условно патогенными дрожжами *Candida tropicalis* у больных атопическим дерматитом легкой степени тяжести не приводила

к подавлению хемилюминесценции, ни спонтанной, ни индуцированной. Более того, в первую неделю начала обострения уровень хемилюминесценции был повышен по сравнению с донорами. Учитывая очень малую выборку, в данном случае можно говорить только о тенденции. Для больных тяжелой формой атопического дерматита все определяемые показатели были достоверно снижены, что соответствует данным литературы.

### Заключение

Значение полученных результатов определяется тем, что показана стимуляция генерации супероксидного аниона лейкоцитарными клетками крови больных атопическим дерматитом в первые дни обострения заболевания при легкой степени тяжести ( $< 20$  по индексу SCORAD) и ограниченно-локализованном типе процесса. Повышение генерации супероксидного аниона в тканях влечёт за собой повышение уровня гидроксильного радикала, который является более мощным окислителем. Кроме того, при взаимодействии супероксидного аниона с молекулой окиси азота образуются реактивные метаболиты азота, высокая концентрация которых способствует развитию патологических изменений в тканях. Контаминация кожи условно-патогенными дрожжами *Candida tropicalis* повышает как спонтанную, так и индуцированную хемилюминесценцию лейкоцитов крови больных атопическим дерматитом. Таким образом, как нормальная, так и повышенная активность нейтрофилов в первые дни заболевания может приводить к порочному кругу, когда средства антибактериальной защиты являются причиной развития патологических изменений в коже.

При тяжелой форме атопического дерматита функциональная активность нейтрофилов достоверно снижена, что согласуется с рядом публикаций зарубежных авторов.

Таблица 4

Хемилюминесценция (импульсы в секунду) на  $1 \times 10^6$  клеток крови доноров и больных атопическим дерматитом, контаминированных *Staphylococcus aureus*, при различной степени тяжести течения в первую неделю обострения\*

	Доноры (n = 14)	Больные атопическим дерматитом. Классификация по индексу SCORAD		
		Легкое течение <20 (n = 4)	Средней тяжести 20 — 40 (n = 11)	Тяжелое течение 40 — 60 (n = 5)
Спонтанная хемилюминесценция	1083 ± 124	921 ± 109	887 ± 126	862 ± 148
Индуцированная хемилюминесценция				
Зимозан	3012 ± 222	2986 ± 213	2598 ± 283	2401 ± 254
<i>Candida tropicalis</i>	2998 ± 182	2750 ± 205	2434 ± 237	2216 ± 321

Примечание. \* Фон составил 300 импульсов в секунду

### Выводы

1. Генерация супероксидного аниона лейкоцитарными клетками крови больных атопическим дерматитом зависит от тяжести течения заболевания и степени распространённости процесса.

2. У больных с легкой степенью тяжести атопического дерматита или при ограниченно-локализованном типе процесса показано небольшое повышение спонтанной и индуцированной хемилюминесценции лейкоцитов.

3. Контаминация кожи условно патогенными дрожжами *Candida tropicalis* сопряжена с повышением спонтанной и индуцированной хемилюминесценции лейкоцитов крови больных атопическим дерматитом в первые дни обострения заболевания при легкой степени процесса.

### References

1. Kandalova O.V., Taratutina N.V., Martinova E.A. Spontaneous and ceramide-induced apoptosis in the skin cells obtained from patients with atopic dermatitis, eczema, and psoriasis, compared with donors. *Patogenez*. 2014; 10 (4): 60-5. (in Russian)

2. Choy D., Hsu D., Seshasayee D., Fung M., Modrusan Z., Martin F. et al. Comparative transcriptomic analyses of atopic dermatitis and psoriasis reveal shared neutrophilic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012; 130 (6): 1335-143.

3. Dhingra N., Suarez-Farinas M., Fuentes-Duculan J., Gittler J., Shemer A., Raz A. et al. Attenuated neutrophil axis in atopic dermatitis compared to psoriasis reflects TH17 pat-

hway differences between these diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013; 132 (2): 498-501.

4. Fierro M., Banche G., Marengo F., Novelli M., Allizond V., Mandras N. et al. Functional and phenotypical impairment of polymorphonuclear cells in atopic dermatitis: an additional cause for the known susceptibility to infections? *Dermatology*. 2012; 224 (4): 323-30.

5. Forte W., Guardian V., Mantovani P., Dionigi P., Meneses M. Evaluation of phagocytes in atopic dermatitis. *Allergol. Immunopathol. (Madr)*. 2009; 37(6): 302-8.

6. Mrowietz U., Konter U., Traut R., Schroder J., Christophers E. Atopic dermatitis: influence of bacterial infections on human monocyte and neutrophil granulocyte functional activities. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1988; 82 (6): 1027-1036.

7. Kim C., Dinauer M. Rac2 is an essential regulator of neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activation in response to specific signaling pathways. *J. Immunol.* 2001; 166 (2): 1223-32.

8. Chen F., Pandey D., Chadli A., Catravas J., Chen T., Fulton D. Hsp90 Regulates NADPH oxidase activity and is necessary for superoxide but not hydrogen peroxide production. *Antioxid. Redox. Signal.* 2011; 14 (11): 2107-19.

9. Marois L., Pare G., Vaillancourt M., Rollet-Labelle E., Naccache P. FcγRIIIb triggers raft-dependent calcium influx in IgG-mediated responses in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 2011; 286 (5): 3509-19.

10. Sonesson A., Bartosik J., Christiansen J., Roscher I., Nilsson F., Schmidtchen A., Back O. Sensitization to skin-associated microorganisms in adult patients with atopic dermatitis is of importance for disease severity. *Acta Derm. Venereol.* 2013; 93: 340-5.

Поступила 02.11.15

### Сведения об авторах:

Елистратова Ирина Владимировна (Elistratova I.V.), канд. мед. наук, врач дерматовенеролог; ФГКУ «Главный военный клинический госпиталь внутренних войск МВД

Захарова Ирина Александровна (Zakharova I.A.), канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ФГБНУ «НИИОПП»

Тарасова Маргарита Валерьевна (Tarasova M.V.), науч. сотр. ФГБНУ «НИИОПП»



Титов Е.А., Соседова Л.М., Новиков М.А.

## **Альтерация ткани головного мозга белых крыс, индуцированная воздействием нанокompозита серебра, инкапсулированного на полимерной матрице**

ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», 665827, г.Ангарск, а/я 1170

*В статье приведены материалы экспериментального внутрижелудочного введения белым беспородным крысам-самцам наночастиц серебра инкапсулированных в полимерную матрицу арабиногалактана. Для сравнения животным вводился отдельно чистый арабиногалактан и раствор колларгола, содержащего серебро в макроформе. В ходе исследования получены данные о состоянии ткани головного мозга при воздействии данных веществ на организм. Гистологический анализ выявил наличие патологического процесса, характер и интенсивность которого различались в зависимости от вида вводимого вещества. В целом, при воздействии арабиногалактана серебра патологический процесс характеризовался появлением в ткани головного мозга периваскулярного отека, а также развитием острого воспалительного процесса с образованием глиальных рубцов, набуханием проводящих пучков.*

**Ключевые слова:** нанокompозит; арабиногалактан; наносеребро; белые крысы; морфология; ткань коры головного мозга.

**Для цитирования:** Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015; 59(4): 41-44.

Titov E.A., Sosedova L.M., Novikov M.A.

## **Alteration of white rats brain tissue inducted by assessment of silver nanocomposite encapsulated in polymer matrix**

FSBSI «East-Siberian Institution of Medical and Ecological Research», 665827, г.Ангарск, а/я 1170

*The paper present experimental materials of intragastric administration of silver nanoparticles encapsulated in polymer matrix of arabinogalactan by white outbred male rats. Animals were injected «pure» arabinogalactan and colloid silver solution containing silver macroform separately for comparison. Research provided data about status of brain tissue at the impact of these substances on organism. Histological analysis revealed the presence of a pathological process, character and intensity of which varied depending on the type of injected material. Pathological process under the influence of silver-arabinogalactan characterized by appearance in brain tissue of perivascular edema and development of acute inflammation in formation of glial scars, swelling of vascular bundles in sum.*

**Keywords:** nanocomposite; arabinogalactan; nanosilver; white rats; morphology; cortical tissue.

**For citation:** Patologicheskaya Fiziologiya I eksperimentalnaya terapiya. 2015; 59(4): 41-44.

**For correspondence:** Sosedova L., e-mail: sosedlar@mail.ru

Развитие нанотехнологий приводит к более углубленному изучению специфических биологических свойств наносеребра, как альтернативы традиционным препаратам данного металла в макроформе (колларгол, протаргол и т.д.) [1]. Наносеребро, сохраняя свойства, присущие последним, в качестве универсального антимикробного и противогрибкового средства [2—4], способно оказывать специфическое действие при минимальных дозах, что позволяет удешевить препараты на основе серебра и сделать их доступными для лечения многих инфекционных заболеваний. Особая привлекательность препаратов наносе-

ребра заключается в отсутствие таких нежелательных побочных проявлений антибактериальной терапии, как аллергические осложнения, токсическое действие на внутренние органы, иммуносупрессия, возникновение дисбактериоза, а также появление устойчивых штаммов возбудителей к используемым антибиотикам.

Существуют многочисленные исследования и теории механизма действия серебра на бактериальную клетку. В целом, можно заключить, что, проникая внутрь клетки, серебро угнетает трансмембранный транспорт  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{++}$ , ингибирует ферменты дыха-

тельной цепи, а также разобщает процессы окисления и окислительного фосфорилирования в микробных клетках, что приводит к гибели микроорганизма [4, 5]. Новым и перспективным направлением является создание терапевтических и диагностических препаратов, основанных на иммобилизации наносеребра на полимерных носителях, что позволяет пролонгировать время действия, снизить токсичность и побочные эффекты, увеличить избирательность воздействия на орган-мишень, а также улучшить стабильность при хранении, то есть обеспечить безопасность и эффективность действия [6]. В качестве матрицы для направленного транспорта наносеребра в последние годы активно исследуется природный полимер из лиственницы сибирской — арабиногалактан, обладающий иммуномодуляторной активностью, гепатопротекторными свойствами [6]. Было выявлено, что наночастицы серебра обладают различными видами токсичности. Наряду с этим установлена высокая стабильность наночастиц серебра в окружающей среде и способность сохранять токсические свойства на протяжении нескольких лет [7]. К настоящему времени выяснено, что действие наночастиц серебра зависит от нескольких параметров, критическими из которых являются доза и способ введения [8, 9].

Таким образом, многие вопросы биологических эффектов действия наночастиц серебра остаются неизученными. Возникает необходимость более углубленного изучения токсикологических аспектов наносеребра при введении его в виде нанокомпозитов. *Целью настоящих исследований* явилось изучение морфофункционального состояния ткани головного мозга белых крыс при пероральном введении наночастиц серебра, инкапсулированных в арабиногалактане.

### Методика

Для проведения исследования из вивария Ангарского филиала ФГБУ «ВНИИ ЭЧ» СО РАМН получены тридцать две особи беспородных белых крыс-самцов в трёхмесячном возрасте и массой от 240 до 280 г. Животные содержались в специальном помещении с 12 часовым светлым/тёмным циклом, регулируемой температурой ( $22 \pm 3^\circ\text{C}$ ) и влажностью, со свободным доступом к чистой водопроводной воде и пище, включающей в себя все необходимые витамины и микроэлементы.

Все исследования на животных были проведены в соответствии с руководящими принципами Национального института здоровья (США) № 85-23, пересмотр 1985 года и Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей (Страсбург, 1986)

Группы животных подбирались в соответствии с методическими рекомендациями «Оценка безопасности наноматериалов», утвержденными приказом № 280 от 12 октября 2007 г. (Москва, Россия).

Животным первой группы (8 особей) внутрижелудочно через зонд на протяжении 9 дней вводили водный раствор аргентоарабиногалактан из расчёта 100 мкг серебра на килограмм массы в 0,5 мл дистиллированной воды.

Животные второй группы (8 особей) также внутрижелудочно получали в эквивалентных количествах раствор стабилизирующего арабиногалактана (без наночастиц серебра). Животные третьей группы (8 особей) аналогичным способом получали водную дисперсию коллоидного серебра (КС), стабилизированного казеином, с содержанием серебра 8%.

Животные четвертой группы (8 особей) являлись контрольными и внутрижелудочно получали обычную дистиллированную воду.

На следующий день после окончания воздействия животные были убиты путём дислокации шейных позвонков. Часть доли печени и головной мозг от каждого исследуемого животного были извлечены и фиксированы в нейтральном буферном растворе формалина (10%), обезвожены этанолом восходящей концентрации (70, 80, 90, 95 и 100%) и помещены в гомогенизированную парафиновую среду для гистологических исследований HistoMix (BioVitrum, Россия). Далее приготовленные с помощью микротомы НМ 400 (Microm, Германия) срезы толщиной 4—5 мкм окрашивались на обычных гистологических предметных стёклах гематоксилином и эозином для обзорной микроскопии. Срезы головного мозга дополнительно окрашивались по Нисслю для визуализации нервных клеток.

Исследование полученных срезов осуществлялось при помощи светооптического исследовательском микроскопе Olympus BX 51 с вводом микроизображений в компьютер при помощи камеры Olympus.

### Результаты и обсуждение

При морфологическом исследовании ткани коры головного мозга белых крыс пероральное введение арабиногалактана серебра вызывало формирование выраженного отёка сосудов и набухание оболочки головного мозга. Отек эндимы сопровождался разрыхлением и набуханием первого слоя коры головного мозга (рис. 1), непосредственно прилежащего к эндиме. В коре головного мозга белых крыс развивался слабо выраженный перичеселлюлярный отек, а в подкорковых структурах — очаговое набухание проводящих пучков (рис. 2).

Следует отметить стаз клеток крови, вследствие повышения её вязкости и выраженный периваскулярный отек сосудов в подкорковых слоях головного мозга. Эндотелий сосудов был значительно утолщен, по сравнению с контрольными препаратами данной зоны. Одним из неблагоприятных аспектов воздействия арабиногалактана серебра на головной мозг являлось развитие в ткани очагов воспаления (рис. 3), с образованием в ряде случаев глиальных рубцов (рис. 4). Наличие в экссудате большого числа лейкоцитов свидетельствовало об остром характере воспаления. Очаги воспаления не имели четкой локализации и у разных животных располагались в различных районах (под эпендимой желудочков, под оболочкой коры головного мозга, в толще коры в районе 3—4 слоя и т.д.) При этом у части животных встречались множественные небольшие очаги воспаления. Наличие глиальных рубцов, являлось, по нашему мнению, реакцией заместительной гиперплазии астроцитов в ответ на повреждение, которая развивается как исход воспаления.

В препаратах головного мозга этой же группы животных отмечалось также незначительное утолщение эпендимы, очаговое разрыхление нейротила, набухание проводящих волокон и стаз крови в сосудах с образованием выраженного периваскулярного отека. Учитывая, что частицы арабиногалактана не проходят через гематоэнцефалический барьер, по нашему мнению, полученные данные связаны с изменением метаболической активности в нервной ткани, что может быть обусловлено дисрегуляцией обменных процессов при воздействии арабиногалактана, изменением функционального состояния сосудов, следствием чего явилось нарушение трофики нервной ткани. Кроме этого возможна совокупность действия данных факторов.

В головном мозге у животных данной группы отмечалось набухание проводящих волокон в коре, что снижает эффективность проведения сигнала по аксонам. Также присутствовал выраженный периваскулярный отек. Однако каких-либо нарушений структуры нейронов, по сравнению с соответствующими контрольными препаратами, не отмечалось.

У контрольных животных, получивших внутрижелудочно дистиллированную воду, каких-либо изменений в структуре головного мозга не наблюдалось.

Таким образом, проведенный эксперимент и выявленные в ходе него морфологические изменения в ткани головного мозга показали, что при воздействии как чистого арабиногалактана, так и арабиногалактана серебра в организме подопытных животных развивался выраженный патологический процесс. Судя по характеру выявленных нарушений, он связан с дисрегуляцией метаболического гомеостаза в тканях

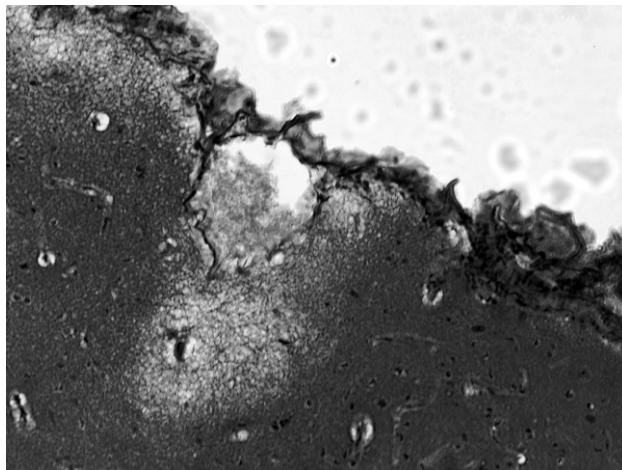


Рис. 1. Набухание мягкой мозговой оболочки и разрыхление нейротила в прилежащих слоях с развитием периваскулярного отека в прилежащих сосудах при воздействии арабиногалактана серебра. Гематоксилин-эозин. Ув.Х400.

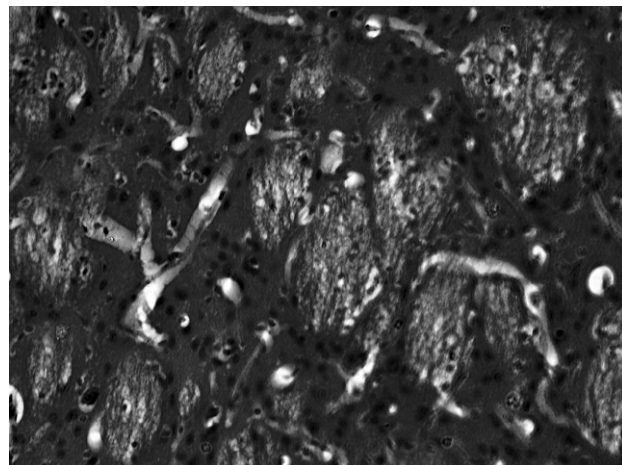


Рис. 2. Очаговое набухание и разрыхление проводящих пучков в подкорковом слое. Гематоксилин-эозин. Ув.Х400.

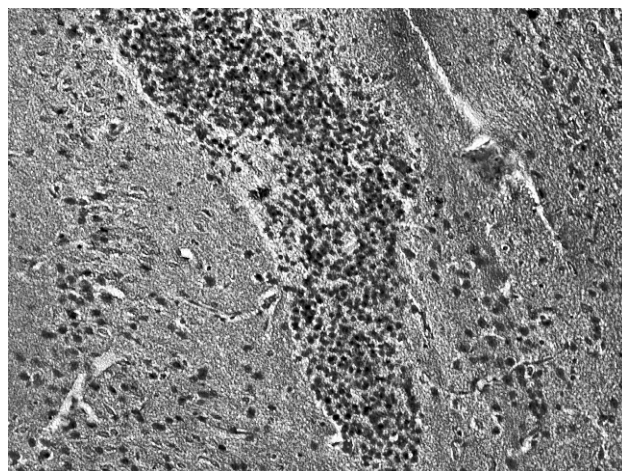


Рис. 3. Ткань коры головного мозга белой крысы при воздействии арабиногалактана серебра. А — очаг воспаления в подкорковых структурах. Гематоксилин-эозин. Ув. X 400.

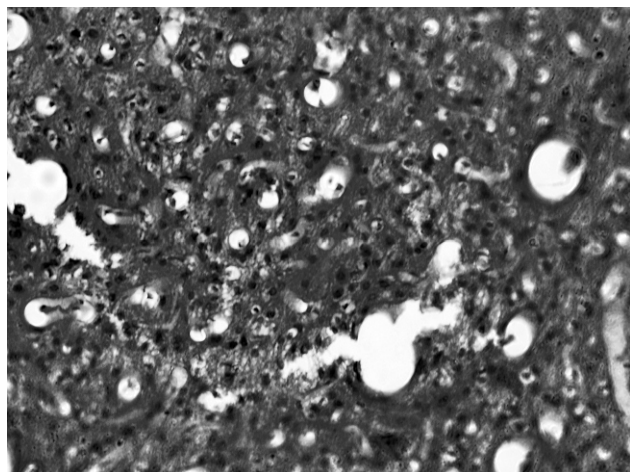


Рис. 4. Образование глиального рубца вследствие воспаления. Вакуолизация нейронов и клеток глии. Гематоксилин-эозин. Ув. X 400.

коры головного мозга, что приводило к формированию перичеллюлярных и периваскулярных отеков и, как следствие, нарушению трофики клеток с последующим развитием в них дистрофических процессов.

В ткани головного мозга при введении арабиногалактана серебра обнаруживался острый воспалительный процесс с образованием глиальных рубцов. В целом, развитие острого воспаления в ткани мозга указывало на значимость токсического воздействия арабиногалактана серебра на организм животного.

Таким образом, внутривенное введение наночастиц серебра, инкапсулированных в природную биоматрицу — арабиногалактан, вызывало развитие патологических нарушений в головном мозге, которые обусловлены дисрегуляцией метаболических процессов в организме животных и несостоятельностью компенсаторно-приспособительных реакций, возникающих в ответ на введение нанокompозита.

В дальнейших экспериментальных исследованиях предполагается решение вопросов, связанных с изме-

нением состояния эндотелия сосудов, как наиболее вероятной мишени воздействия и длительностью сохранения морфологических изменений во внутренних органах.

## References

1. Voronkov M.G., Antonik L.M., Lopyrev V.A., Abzaeva K.A., et al. Antimicrobial and hemostatic effects of silver-containing poly(acrylic acid) derivatives. *Pharmaceutical chemistry journal*. 2001; 35(5): 252-3.
2. Colleen M. Santoro, Nicole L. Duchsherer et al. Antimicrobial efficacy and ocular cell toxicity from silver nanoparticles. *Nanobiotechnology*. 2007; 3(2): 55-65
3. Hung-Li Liu, Shenghong A Dai, Keng-Yen Fu, Shan-hui Hsu. Antibacterial properties of silver nanoparticles in three different sizes and their nanocomposites with a new waterborne polyurethane. *International Journal of Nanomedicine*. 2010;5 1017-28.
4. Irwin P., Martin J., Ly-Huong Nguyen, Yiping He, et al. Antimicrobial activity of spherical silver nanoparticles prepared using a biocompatible macromolecular capping agent: evidence for induction of a greatly prolonged bacterial lag phase. *J Nanobiotechnology*. 2010, 8: 34.
5. Guzman M., Dille J., Godet S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2012; 8(1): 37-45.
6. Medvedeva S., Aleksandrova G., Grischenko L. Transformation of larch polysaccharide. *The 11th Intern.Symp. on Wood Pulp Chem.* Nice, France. 2001; Vol. II: 123-6.
7. Yen H.-J., Hsu S.-h., Tsai Ch.-L. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small*. 2009; 5(13): 1553-61.
8. Trofimov BA, Sukhov BG, Aleksandrova GP, Medvedeva SA, et al. Nanocomposites with magnetic, optical, catalytic, and biologically active properties based on arabinogalactan. *Doklady Chemistry*. 2003; 393: 287-8.
9. Witt K.L., Livanos E., Kissling G.E., Torous D.K. et al. Comparison of flow cytometry- and microscopy-based methods for measuring micronucleated reticulocyte frequencies in rodents treated with nongenotoxic and genotoxic chemicals. *Mutation research*. 2008; 649(1-2): 101-13.

Поступила 31.07.14

## Сведения об авторах:

Титов Евгений Алексеевич, науч. сотр. лаб. токсикологии, канд. биол. наук, e-mail: G57097@yandex.ru  
Новиков Михаил Александрович, мл. науч. сотр. лаб. токсикологии, аспирант, e-mail: novik375@bk.ru

Кожевникова Л.М.<sup>1</sup>, Цорин И.Б.<sup>2</sup>, Варков А.И.<sup>2</sup>, Столярук В.Н.<sup>2</sup>,  
Вититнова М.Б.<sup>2</sup>, Колик Л.Г.<sup>2</sup>, Суханова И.Ф.<sup>3</sup>, Крыжановский С.А.<sup>2</sup>

## **Реактивность сосудов и экспрессия рецепторов эндогенных вазоконстрикторов у крыс с алкогольной кардиомиопатией и изоляционным стрессом**

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

<sup>2</sup> — ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

<sup>3</sup> — ФГБНУ «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова», 119334, Москва, ул. Вавилова, д. 26

На модели алкогольной кардиомиопатии исследовано влияние хронического потребления этанола и изоляционного стресса на реактивность изолированной аорты крысы и экспрессию рецепторов эндогенных вазоконстрикторов в аорте. Принудительную алкоголизацию беспородных крыс проводили в течение 24—28 нед., используя в качестве единственного источника жидкости 10%-ный раствор этанола. При оценке результатов исследования учитывался возраст животных. Установлено, что реактивность изолированных колец аорты, выделенных из организма старых (40—45 нед.) нестрессированных крыс, в ответ на воздействие эндотелина-1 (ЕТ1), норадреналина (НА), аргининвазопрессина (АВР) или ангиотензина II (АТII) не отличается от таковой сосудов молодых животных. Однако с увеличением продолжительности жизни повышается чувствительность сосудов к вазоконстрикторному действию серотонина (5HT). Длительный изоляционный стресс и потребление высоких доз этанола на фоне стресса приводят к увеличению ЕТ1- и НА-индуцированного сокращения колец аорты и к значительному уменьшению сократительной реакции аорты на воздействие АТII и АВР. Стресс и алкоголь в сочетании со стрессом вызывают снижение уровня мРНК ЕТА-R, АТ1А-R и V1А-R и увеличение содержания мРНК  $\alpha_1$ -AR в аорте крыс. Обнаружено, что в сосудах стрессированных и алкоголизированных животных снижен уровень экспрессии цитозольных глюкокортикоидных рецепторов (GR), которые являются фактором транскрипции для генов ЕТА-R, АТ1А-R V1А-R. Предполагается, что развитие гипореактивности сосудов стрессированных и алкоголизированных крыс к действию АТII и АВР происходит в результате снижения экспрессии их рецепторов по GR-зависимому механизму. Показано, что под влиянием этанола сосуды становятся избирательно гипореактивными по отношению к действию 5HT. Механизм этого процесса пока неясен. Изменения сократительных свойств сосудов, извлеченных из организма крыс через 1 мес. после отмены приема этанола (стадия абстиненции), были аналогичны изменениям, выявленным на сосудах алкоголизированных животных. Таким образом, большое значение в нарушении нейроэндокринной регуляции сосудистого тонуса при длительном потреблении этанола имеет стрессорный компонент. Кроме того, на данной экспериментальной модели мы не получили данных в пользу непосредственного влияния этанола на развитие артериальной гипертензии.

**Ключевые слова:** алкогольная кардиомиопатия, этанол, стресс, абстиненция, тонус сосудов, экспрессия мРНК рецепторов.

**Для цитирования:** Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015; 59(4): 45-57.

Kozhevnikova L.M.<sup>1</sup>, Tsorin I.B.<sup>2</sup>, Varkov A.I.<sup>2</sup>, Stolyaruk V.N.<sup>2</sup>,  
Vititnova M.B.<sup>2</sup>, Kolik L.G.<sup>2</sup>, Sukhanova I.F.<sup>3</sup>, Kryzhanovskii S.A.<sup>2</sup>

## **Vascular reactivity and receptor expression of endogenous vasoconstrictor in rats with alcoholic cardiomyopathy and insulation stress**

<sup>1</sup> — Institute of General pathology and pathophysiology, Russia, 125315, Moscow, Russia, Baltiyskaya str., 8

<sup>2</sup> — Institute of pharmacology. V.V. Zakusova, 125315, Moscow, Russia, Baltiyskaya str., 8

<sup>3</sup> — Institute of biology of development. N.T. Koltsova, 119334, Moscow, Russia, Vavilova str., 26

On the model of alcohol cardiomyopathy studied the effect of chronic ethanol consumption and the insulation stress on the reactivity of isolated rat aorta and the expression of the endogenous vasoconstrictor receptors in the aorta. Pushing alcoholization outbred rats was carried out for 24—28 weeks, using as the sole source of liquid 10% ethanol solution. In as-

**Для корреспонденции:** Кожевникова Любовь Михайловна, доктор мед. наук, зав. лаб. патологии клеточной рецепции ФГБНУ «НИИОПП», e-mail: lubovmih@yandex.ru

sessing the results of the study took into account the age of the animals. It is found that the reactivity of isolated aortic rings dissected from the body of old (40—45 weeks) nonstressed rats in response to endothelin-1 (ET1), noradrenaline (NA), arginine vasopressin (AVP) or angiotensin II (ATII) is not different from such reactivity for young animals. However, with the increase in life expectancy increases the sensitivity of vessels to vasoconstrictor action of serotonin (5HT). Prolonged stress insulation and the consumption of high doses of ethanol the stress lead to increased ET1- and NA- induced contraction of the aortic rings and a significant decrease in contractile response of the aorta to the impact ATII and AVP. Stress and alcohol in combination with stress causing reduction mRNA ETA-R, AT1A-R. and VIA-R and increased mRNA  $\alpha_1$ -AR in rat aorta. It is found that in the vessels of stressed and alcoholized animals reduced level of expression of cytosolic glucocorticoid receptors (GR), which is a transcription factor for genes ETA-R, AT1A-R VIA-R. It is proposed that the development of vascular hyporesponsiveness of stressed and alcoholized rats to action ATII and AVP is the result of reducing the expression of their receptors on the GR- dependent mechanism. It is shown that under the influence of ethanol vessels become hyporeactivity selectively with respect to the action of 5HT. The mechanism of this process is unclear. Importantly, the changes in the contractile properties vessels recovered from the rat at 1 month after the abolition of the reception of ethanol (step abstinence) were similar to changes found at the alcoholized animals. Thus, the importance of breaking the neuroendocrine regulation of vascular tone during long-term consumption of ethanol has a stressor components. Furthermore, in this experimental model we not received data in favor ethanol direct impact on the development of hypertension.

**Key words:** alcoholic cardiomyopathy; ethanol; stress; abstinence; vascular tone; expression of receptor mRNA.

**For citation:** *Patologicheskaya Fiziologiya I eksperimentalnaya terapiya*. 2015; 59(4): 45-57.

**For correspondence:** Kozhevnikova L.M., e-mail: lubovmih@yandex.ru

Алкогольная кардиомиопатия является одной из основных причин, определяющих высокий уровень смертности пациентов, страдающих хроническим алкоголизмом. Патогенез этого заболевания достаточно хорошо изучен — в его основе лежит некоронарогенное, невоспалительное, моноэтиологичное алкоголь-обусловленное токсическое повреждение миокарда. Если механизмы, лежащие в основе повреждающего действия алкоголя на сердечную мышцу, известны, то особенности алкоголь-обусловленного нарушения сосудистого тонуса, сопутствующего алкогольной кардиомиопатии, до настоящего времени мало изучены. Вместе с тем, эта проблема представляется достаточно актуальной, поскольку из клиники известно, что у пациентов, страдающих II стадией алкогольной кардиомиопатии, в большинстве случаев отмечается умеренное повышение АД (160—180/90—110 мм рт.ст.), имеющее тенденцию к повышению (вплоть до гипертонического криза) в период абстиненции. По мере прогрессирования заболевания и перехода его в III стадию может наблюдаться как гипертензия (преимущественно диастолическая), так и относительная гипотензия.

Впервые концепция о связи между чрезмерным потреблением этанола и развитием артериальной гипертензии была высказана в начале прошлого века [1]. В последующие годы эта гипотеза была подтверждена многочисленными эпидемиологическими исследованиями [2—4]. Тем не менее, молекулярные механизмы потенцирующего действия алкоголя на развитие артериальной гипертензии, остаются неизвестными. Это обусловлено главным образом тем, что влияние алкоголя на сердечно-сосудистую систему является многофакторным процессом, основанным на сложном взаимодействии метаболических, генетических, социальных и экологических факторов [5, 6].

Наиболее изучено негативное влияние алкоголя на центральную нервную систему [7]. Установлено, что многочисленные психические изменения, вызванные хроническим потреблением алкоголя, связаны с изменением уровня экспрессии рецепторов важнейших нейромедиаторов головного мозга глутамата, дофамина и серотонина [6, 8—11].

Возможные механизмы, лежащие в основе этанол-индуцированной гипертензии, были предложены на основании клинических и экспериментальных наблюдений. К ним относятся увеличение активности симпатической нервной системы, ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, окислительный стресс, повышение концентрации внутриклеточного  $Ca^{2+}$  в гладкомышечных клетках сосудов и дисфункция эндотелия [12—15].

Важную роль в изучении влияния хронического потребления алкоголя на миогенные механизмы регуляции сократительной функции гладкомышечных клеток сосудов играют исследования на экспериментальных моделях алкоголизма у животных. Вместе с тем, следует отметить, что результаты многочисленных экспериментальных исследований довольно противоречивы, что, по-видимому, связано с особенностями эксперимента, количеством и продолжительностью потребления алкоголя. По данным одних авторов, чувствительность аорты к вазоконстрикторному действию агониста  $\alpha$ -адренорецепторов ( $\alpha$ -AR) фенилэфрина возрастает уже через 2 дня от начала потребления 5% раствора этанола. Увеличение концентрации потребляемого этанола до 10 и 20% существенно не влияет на выраженность фенилэфрин-индуцированного увеличения сократительного ответа колец аорты, выделенной из организма крыс через 2 и 3 нед. от начала эксперимента [16]. По мере увеличе-

ния периода потребления крысами алкоголя чувствительность сосудов к вазоконстрикторному действию агонистов  $\alpha$ -AR повышается сначала в аорте, затем в сонной и брыжеечной артериях [17].

Напротив, по данным других авторов [18], потребление 7,2% раствора алкоголя в течение 4 нед. существенно не влияет на реактивность изолированных колец аорты по отношению к действию фенилэфрина, серотонина, эндотелина-1 и KCl, но потенцирует релаксацию сосудов, вызванную агонистом мускариновых рецепторов ацетилхолином. Более того, установлено, что сократительная реакция изолированных фрагментов грудного отдела аорты, извлеченного из организма крыс после 24-х нед. перорального приема 7,2% раствора этанола, снижается в ответ на воздействие агониста  $\alpha$ -AR фенилэфрина. При этом этанол не влияет на NO-зависимые механизмы релаксации колец аорты [19]. Увеличение концентрации ежедневного потребляемого раствора этанола до 20% (6 нед.) не изменяет чувствительность аорты по отношению к действию норадреналина (NA) как в присутствии, так и в отсутствие эндотелиального слоя [20]. По данным этих авторов, только при употреблении алкоголя на фоне стресса развивается гиперчувствительность сосудов к действию катехоламинов. Показано, что активация  $\alpha$ -AR индуцирует высвобождение эндотелиальными клетками простагландинов, которые усиливают сокращение гладкомышечных клеток (ГКМ) сосудов. Гиперреактивность сосудов по отношению к NA устраняется путем удаления эндотелия или в присутствии ингибитора циклооксигеназы индометацина [20].

Показано, что длительное потребление этанола приводит к повышению уровня эндотелина-1 в крови [21] и увеличению ET1-индуцированного сокращения изолированных фрагментов сонной артерии крыс, при этом в сосудах экспрессия мРНК вазоконстрикторных ETA и вазодилаторных ETB-рецепторов остается неизменной [22]. В настоящее время остаются не ясными процессы, лежащие в основе негативного влияния хронического потребления алкоголя на рецепторопосредованные механизмы регуляции миогенного тонуса сосудов [23, 24].

*Цель настоящего исследования* — изучение реактивности сосудов и особенности экспрессии мембранных рецепторов эндогенных вазоконстрикторов у крыс со сформировавшейся алкогольной кардиомиопатией и сопутствующим изоляционным стрессом.

### Методика

Эксперименты выполнены на беспородных белых крысах-самцах ( $n = 35$ ), полученных из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Феде-

рального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая». Животные содержались в стандартных условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» в зависимости от условий эксперимента (см. ниже) в общих клетках (580 x 375 x 200 мм) в группах по пять особей в каждой или отдельно, в индивидуальных клетках (370 x 200 x 150 мм) при контролируемом освещении (12 ч — свет/12 ч — темнота) и постоянной температуре (21—23°C) со свободным доступом к воде и брикетированному корму в течение 10 суток до начала тестирования. Условия содержания животных соответствовало приказу МЗ РФ № 708н «Об учреждении правил лабораторной практики» от 23.08.2010 и этическим нормам, изложенным в Правилах лабораторной практики (GLP) Хельсинской декларации (2000).

Включенные в исследование животные были рандомизированы на 5 групп:

- 1-я группа ( $n = 10$ , возраст 10—12 нед., масса 180—230 г) — интактные «молодые» крысы. Животные содержались в общих клетках в течение 2 нед.;
- 2-я группа ( $n = 10$ , возраст 40—45 нед., масса 480—550 г) — интактные «старые» крысы. Животные содержались в общих клетках в течение 28 нед.;
- 3-я группа ( $n = 5$ , возраст 40—45 нед., масса 480—600 г) — «старые» стрессированные крысы. Животные содержались в индивидуальных клетках в течение 28 нед. Длительную принудительную изоляцию рассматривали как модель изоляционного стресса;
- 4-я группа ( $n = 5$ , возраст 40—45 нед., масса 480—600 г) — «старые» стрессированные крысы со сформировавшейся алкогольной кардиомиопатией. Животные содержались в индивидуальных клетках в течение 28 нед. Алкогольную кардиомиопатию моделировали согласно разработанной нами трансляционной модели, воспроизводящей эту патологию [25] и свидетельствующей о том, что дилатационная алкогольная кардиомиопатия формируется у крыс к концу 24-й нед. принудительного потребления алкоголя. Принудительную алкоголизацию животных проводили путем использования в качестве единственного источника жидкости 10%-ного водного раствора этанола в течение 24 нед. На протяжении всего периода исследования еженедельно регистрировали количество потребляемого этанола (г/кг в пересчете на чистый этанол среднее потребление алкоголя в течение эксперимента варьировало в пределах 5,0—6,5 г/кг в сут.);
- 5-я группа ( $n = 5$ , возраст 40—45 нед., масса 480—600 г) — «старые» стрессированные крысы со сформировавшейся алкогольной кардиомиопатией в состоянии алкогольной абстиненции. Животные содержались в индивидуальных клетках в течение 28 нед. Алкогольную кардиомиопатию воспроизво-

дили также как и у животных 4-й группы. По окончании 24 нед. алкоголизации прекращали принудительный прием алкоголя, заменив его питьевой водой, которую крысы получали в течение 1 мес.

Оценку влияния длительного воздействия стресса, алкогольной кардиомиопатии и абстинентного синдрома на сократительные свойства сосудов и экспрессию рецепторов эндогенных вазоконстрикторов проводили через сутки после истечения планового срока эксперимента. Животных наркотизировали 25%-ным раствором уретана (4 мл/кг). Затем крыс декапитировали, вскрывали грудную клетку, извлекали грудной отдел аорты и помещали его в охлажденный физиологический раствор Krebsa—Хенслайта. Сосуды очищали от жировой и соединительной тканей и нарезали на кольца шириной 1,5—2,0 мм. От каждого сосуда в эксперимент брали по 2 кольца. Кольцевые фрагменты сосудов крепили на держателях, помещенных в раствор Krebsa—Хенслайта (37°C), аэрируемый смесью O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>(95/5%). Состав раствора Krebsa—Хенслайта в мМ: NaCl — 121; KCl — 4,69; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 1,1; NaHCO<sub>3</sub> — 23,8; MgSO<sub>4</sub> — 1,6; CaCl<sub>2</sub> — 1,6; ЭДТА — 0,032; D-глюкоза — 8. Силу сокращения изолированных фрагментов аорты измеряли в изометрическом режиме по методу Мульвани согласно ранее описанному протоколу [26]. Функциональную активность вазоконстрикторных рецепторов оценивали с помощью фармакологического анализа с применением селективных лигандов. Были использованы серотонин (5HT), норадреналин (NA), эндотелин-1 (ET1), аргининвазопрессин (AVP) и ангиотензин II (ATII) (Sigma, США). О целостности эндотелиального слоя сосудов судили по степени их расслабления на действие агониста мускариновых рецепторов карбахола (Sigma).

#### *Препарирование тканей для молекулярных исследований*

Препарирование тканей грудного отдела аорты крысы, для молекулярных исследований, проводили в физиологическом растворе при +4°C. После очистки фрагмента аорты от соединительной ткани и жира его помещали в Ever Fresh RNA (Силекс) и хранили до выделения РНК при -20°C. Сосуд, извлеченный из раствора Ever Fresh RNA, освобождали от остатков жидкости и гомогенизировали при помощи жидкого азота и фарфоровой ступки и переносили в TRI<sup>®</sup> Reagent (Sigma), исходя из пропорции на 1 образец 1 мл реагента.

#### *Выделение тотальной РНК*

Выделение тотальной РНК из аорты крысы осуществляли с помощью TRI<sup>®</sup> Reagent (Sigma) согласно протоколу производителя.

#### *Синтез кДНК библиотек*

Концентрацию РНК и примесей в образцах определяли на спектрофотометре NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 («ThermoFisherScientificInc.», США). В дальнейшую пробоподготовку брали образцы суммарной РНК с отношением показателей абсорбции при длинах волн 260/280 нм не ниже 1,7. Основываясь на полученных данных о концентрации тотальной РНК в растворе, брали 1 мкг тотальной РНК для обработки ДНКазой (Fermentas) согласно протоколу производителя. кДНК библиотеки синтезировали с помощью набора «Синтез первой цепи кДНК» (Силекс, Россия) согласно протоколу производителя с использованием гексануклеотидных праймеров.

#### *ПЦР в реальном времени*

Для амплификации полученных в ходе реакции ОТ фрагментов комплементарной ДНК исследуемых генов и детектирования в режиме реального времени продуктов ПЦР (ПЦР-РВ) использовали специфические праймеры и универсальный набор реактивов фирмы «Евроген» (Россия), содержащий референтный краситель ROX. ПЦР в реальном времени проводили на приборе ABI Prizm 7500 по следующему температурно-временному протоколу:

- 1) начальная денатурация — 95°C, 5 мин;
- 2) термоциклирование (45 циклов) с шагами денатурация — 95°C, 15 с, отжиг и элонгация — 60°C, 1 мин.

Протестировав β-актин, eF1A (elongation factor 1 alpha) и GAPDH в качестве возможных эндогенных контролей нами был выбран β-актин, так как его экспрессия имела наименьший разброс во всех исследованных образцах.

Праймеры для генов β-актин, eF1A, ratAdra1a, rat V1A-R, rat ETA-R, rat AT1A-R, rat GR были предоставлены ООО «ДНК-Синтез» с дополнительным праймером-зондом, содержащим флуоресцентный краситель FAM и его тушитель BHQ1. Для 5HT-рецепторов использованы следующие последовательности праймеров:

- 5HT2A-R —  
F=5'-CGCTATGTCGCCATCCAGAAC-3',  
R=5'-CAGATATGGTCCACACGGCAATG-3',  
зонд=5'-FAM-TCACCACAGCCGCTTCAACTCCAGA-BHQ1-3';

- для 5HT2B-R —  
F=5'-TGC TGA CAA AGG AAC GTT TTG G -3'  
R=5'-TTA GGC GTT GAG GTG GCT TG -3'  
зонд=5'-FAM-TGC TCT TTG GCT CAC TGG CTG CCT -BHQ1-3'

Обработка полученных данных проводилась с использованием метода ddCt с учетом эффективности праймеров. Статистическая обработка данных прово-



дилась по программам Sigma Plot и Statistica 6.0. При оценке данных использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия между показателями считались достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

### Влияние хронического потребления этанола и изоляционного стресса на реактивность изолированных колец аорты крыс

Установлено, что чувствительность изолированных колец аорты, выделенных из организма старых крыс (2-я группа), по отношению к действию эндотелина-1, норадреналина, ангиотензина II и аргининвазопрессина существенно не отличается от таковой сосудов молодых животных (1-я группа) (рис. 1). Вместе с тем, с увеличением продолжительности жизни животных повышается реактивность сосудов к вазоконстрикторному действию низких и средних доз серотонина (0,1—5 мкМ). Так, сила сокращения аорты на воздействие моноамина в концентрации 1 мкМ возрастает в 1,7 раза по сравнению с реакцией сосудов молодых крыс (1-я группа) ( $535 \pm 18$  и  $324 \pm 13$  мг соответственно) (рис. 1).

Выявлено, что при длительной изоляции крыс (3-я группа) развиваются различные по выраженности и направленности изменения сосудистой реактивности по отношению к исследуемым вазоконстрикторным соединениям. В результате продолжительного воздействия стресса достоверно возрастает сила изометрического сокращения колец аорты в ответ на воздействие NA и в большей степени ET1 по сравнению с реакцией сосудов молодых и старых нестрессированных крыс (рис. 1). Установлено, что сосуды старых стрессированных крыс, как и сосуды старых крыс, гиперреактивны к вазоконстрикторному действию 5HT (2-я группа). Вместе с тем, наблюдается значительное снижение чувствительности сосудов стрессированных крыс к действию АТII и AVP, о чем свидетельствовало уменьшение агонист-индуцированного прироста силы сокращения аорты в 3 и 2,2 раза соответственно по сравнению с реакцией сосудов молодых и старых животных (1-я и 2-я группы) (рис. 1).

Как видно на рис 1, при длительном потреблении этанола в сочетании со стрессом (4-я группа) еще в большей степени возрастает чувствительность изолированных колец аорты к действию ET1 и NA и значительно уменьшается вазоконстрикторный ответ на АТII и AVP. Следует отметить, что степень снижения сократительной реакции на воздействие АТII и AVP сосудов алкоголизованных на фоне стресса крыс была сопоставима с реакцией сосудов стрессированных крыс (3-я группа).

Этанол противоположным образом изменял реакцию изолированных колец аорты в ответ на воздействие 5HT (рис. 1). Сосуды алкоголизованных крыс были гипореактивны по отношению к действию 5HT, в то время как сосуды животных 2-й и 3-й групп, напротив, гиперреактивны. Так, прирост силы сокращения сосудов алкоголизованных крыс в ответ на воздействие 5HT в концентрации 1 мкМ уменьшается в 3,8 раза по сравнению с реакцией сосудов, выделенных из организма старых и старых стрессированных крыс, и в 2 раза по сравнению с сосудами молодых животных (1-я группа).

Характер изменений сократительных свойств сосудов, извлеченных из организма крыс после отмены приема этанола в состоянии абстиненции (5-я группа), был аналогичен тем, которые мы наблюдали на сосудах алкоголизованных животных (4-я группа). Вместе с тем отмена потребления алкоголя оказывала дополнительное негативное влияние на сниженную стрессом и алкоголем чувствительность сосудов к вазоконстрикторному действию AVP (рис. 1). AVP-индуцированный прирост силы сокращения колец аорты, выделенных из организма крыс в состоянии абстиненции, уменьшался до 24%, а у непрерывно потребляющих алкоголь — до 58% по сравнению с контролем (1-я и 2-я группы). Кроме того, через

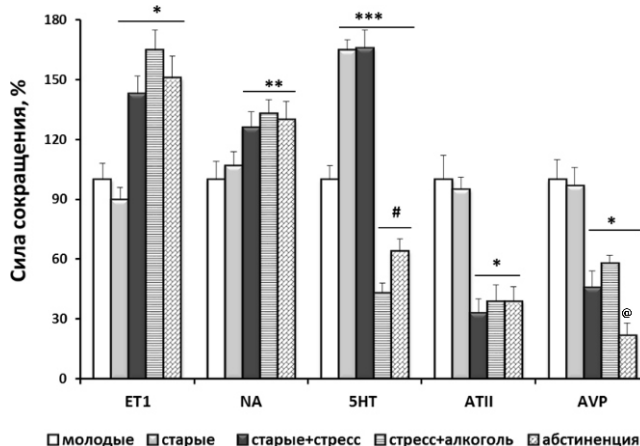
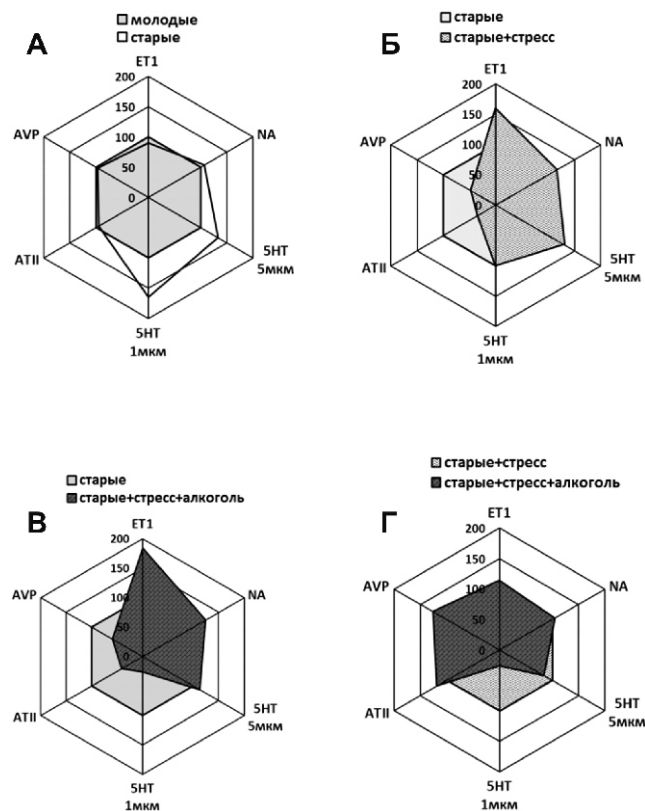
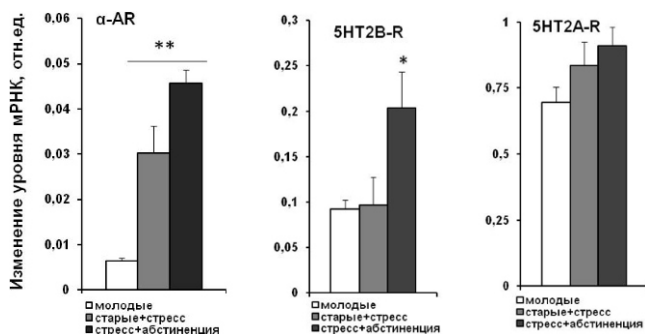


Рис. 1. Влияние длительного воздействия изоляционного стресса и алкоголя на сократимость изолированных колец аорты в ответ на воздействие эндотелина-1 (ET1), норадреналина (NA), серотонина (5HT), ангиотензина II (АТII) и аргининвазопрессина (AVP). За 100% принята величина агонист-индуцированного сокращения колец аорты молодых крыс (1-я группа).

\* —  $p < 0,01$  для ET1, АТII и AVP по сравнению с реакцией сосудов молодых (1-я группа) и старых нестрессированных (2-я группа) крыс;  
 \*\* —  $p < 0,05$  для NA по сравнению с 1-й и 2-й группой;  
 \*\*\* —  $p < 0,01$  для 5HT по сравнению с 1-й группой;  
 # —  $p < 0,01$  для 5HT по сравнению с сосудами молодых, старых и старых стрессированных (3-я группа) крыс;  
 @ —  $p < 0,05$  для AVP различия между реакцией сосудов алкоголизованных (4-я группа) и находящихся в состоянии абстиненции (5-я группа) крыс.



**Рис. 2.** Влияние возраста животных (А), продолжительного изоляционного стресса (Б) и алкоголизации (В, Г) на реактивность изолированных колец аорты по отношению к действию эндогенных вазоконстрикторов. На каждом луче лепестковой диаграммы представлены контрольные данные (принятые за 100%), полученные на сосудах молодых (1-я группа, А), старых (2-я группа, Б, В) и старых стрессированных (3-я группа, Г) крыс и данные соответствующих групп сравнения.



**Рис. 3.** Изменение уровня мРНК генов  $\alpha$ -адренорецепторов ( $\alpha$ -AR) и серотониновых рецепторов 5HT2В- и 5HT2А-типа в аорте стрессированных (3-я группа) и алкоголизованных крыс в состоянии абстиненции (5-я группа). \* —  $p < 0,05$  и \*\* —  $p < 0,01$  по сравнению с уровнем мРНК в аорте молодых крыс.

1 мес. после прекращения принудительной алкоголизации животных наблюдалась тенденция к увеличению сниженной под влиянием алкоголя чувствительности сосудов к действию 5HT (рис. 1).

Данные, полученные в экспериментах *in vitro*, свидетельствуют о том, что длительное воздействие стресса или стресса в сочетании с потреблением этанола приводят к значительным изменениям реактивности сосудов, которые проявляются в виде гиперчувствительности к действию ET1 и NA и гипореактивности по отношению к действию AVP, ATII и 5HT (рис. 2, Б, В). Причем алкоголь избирательно негативно влияет на серотонинергическую регуляцию сократимости сосудов, усугубляя таким образом изменения, вызванные длительным изоляционным стрессом (рис. 2, Г).

#### Влияние хронического потребления этанола и изоляционного стресса на экспрессию рецепторов в аорте крыс

Выявленные изменения реактивности изолированных колец аорты стрессированных и алкоголизованных крыс могли быть обусловлены комплексом причин, и, прежде всего, нарушениями на уровне рецепторов и сигнальных систем в гладкомышечных и эндотелиальных клетках. Поэтому в следующих сериях опытов нами было изучено влияние длительного потребления этанола и стресса на экспрессию рецепторов эндогенных вазоконстрикторов, локализованных в плазматической мембране, а также цитозольных глюкокортикоидных рецепторов (GR). Как видно на рис. 3, изоляционный стресс приводит к многократному увеличению уровня экспрессии  $\alpha$ -адренорецепторов ( $\alpha$ -AR) в аорте крыс. Еще в большей степени возрастает содержание мРНК  $\alpha$ -AR в сосудах алкоголизованных крыс после отмены этанола (5-я группа): содержание их мРНК возрастает в 7 и 1,5 раза по сравнению с аналогичными величинами в сосудах молодых и стрессированных животных соответственно (рис. 3). При абстинентном синдроме в аорте более чем в 2 раза увеличивается содержание мРНК для серотониновых рецепторов 5HT2В-типа и не изменяется для рецепторов 5HT2А-типа (рис. 3).

Выявлено, что в сосудах, извлеченных из организма старых стрессированных крыс (3-я группа), снижается содержание мРНК для эндотелиновых рецепторов ЕТА-типа (ЕТА-R) (рис. 4, А). Уменьшается экспрессия генов, ответственных за синтез ангиотензиновых (AT1A-R) и вазопрессиновых (V1A-R) рецепторов. Так, в аорте стрессированных животных уровень мРНК для AT1A-R и V1A-R снижается в 1,9 и 1,8 раза по сравнению с содержанием мРНК этих рецепторов в сосудах молодых крыс соответственно (рис. 4, Б, В). Аналогичные данные об уменьшении

содержания мРНК для ETA-R, AT1A-R и V1A-R получены и на сосудах алкоголизованных крыс.

Судя по результатам исследований, определяющее значение в снижении уровня мРНК для AT1A-R и V1A-R и в развитии гипореактивности сосудов по отношению к действию АП II и АVP имеет длительное воздействие стресса, а не этанола. Поскольку важную роль в реализации стресс-реакции играют глюкокортикоидные гормоны, нами было изучено влияние изоляционного стресса и этанола на экспрессию цитозольных GR в сосудах. Установлено, что с увеличе-

нием продолжительности жизни животных в аорте крыс увеличивается содержание мРНК для GR (рис. 4, Г). В то время как в сосудах старых крыс, подвергнутых длительному воздействию стресса или стресса в сочетании с потреблением этанола, напротив, содержание мРНК для GR уменьшается в 1,7 и 1,6 раза соответственно по сравнению с сосудами старых животных (рис. 4, Г).

Известно, что стресс, вызванный различными социальными факторами, провоцирует потребление алкоголя и способствует алкоголизации населения [27,

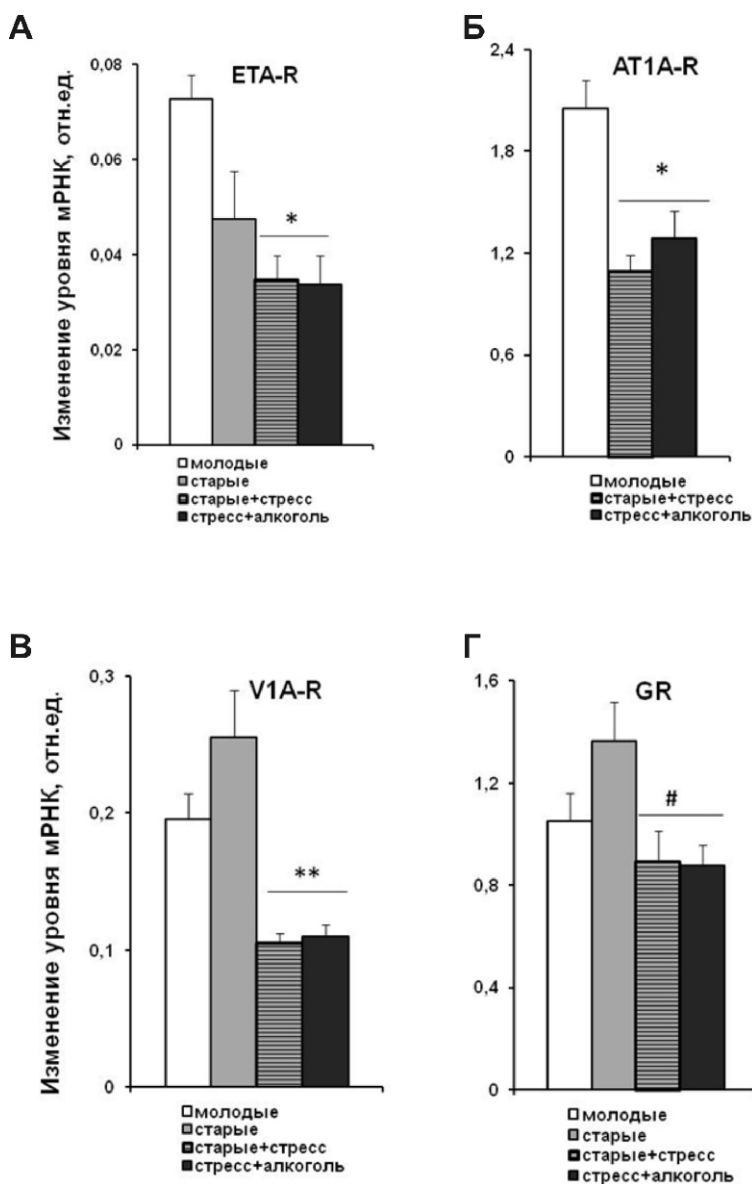


Рис. 4. Изменение уровня мРНК генов эндотелиновых (ETA-R, А), ангиотензиновых (AT1A-R, Б), вазопрессиновых (V1A-R, В) и глюкокортикоидных (GR, Г) рецепторов в аорте старых (2-я группа), стрессированных (3-я группа) и алкоголизованных (4-я группа) крыс. \* —  $p < 0,05$  по сравнению с уровнем мРНК в аорте молодых крыс (1-я группа); \*\* —  $p < 0,01$  по сравнению с 1 и 2 группой; # —  $p < 0,05$  по сравнению со 2-й группой.

28]. Несмотря на то, что экспериментальные и эпидемиологические исследования свидетельствуют о важной патогенетической роли стресса и хронического потребления этанола в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, тем не менее, многие аспекты негативного влияния этанола на развитие, в частности, артериальной гипертензии, остаются неясными. Полагают, что низкие дозы алкоголя могут уменьшать артериальное давление за счет позитивного влияния на экспрессию NO-синтазы и синтез NO в эндотелиальных клетках, в то время как хроническое потребление больших доз алкоголя приводит к дисфункции эндотелия [29, 30]. Более того, в ряде работ показано, что длительное хроническое потребление алкоголя либо не влияет на показатели артериального давления [20, 31], либо, напротив, оказывает гипотензивный эффект [32, 33]. Как свидетельствуют многочисленные исследования, потребление этанола на фоне стресса может вызывать повышение артериального давления, а выраженность негативного влияния на тонус кровеносных сосудов зависит от характера, силы и продолжительности стресса.

Полученные в настоящем исследовании данные также свидетельствуют о том, что длительное потребление этанола в сочетании с воздействием стресса приводит к значительным изменениям сократительных свойств сосудов и экспрессии рецепторов эндогенных вазоконстрикторов. При этом большой вклад в дисрегуляцию тонуса сосудов вносит стрессорный компонент. Так, в сосудах, выделенных из организма стрессированных, алкоголизованных на фоне стресса или в состоянии абстиненции крыс, в равной степени повышается чувствительность к действию NA. Следует отметить, что при относительно небольшом NA-индуцированном увеличении сократительной реакции колец аорты стрессированных крыс и крыс в условиях отмены этанола, уровень экспрессии  $\alpha$ -AR в аорте возрастает многократно (рис. 1 и 3). Возможно, это обусловлено тем, что скорость синтеза мРНК при активации экспрессии данных рецепторов превосходит скорость синтеза их рецепторных белков. По-видимому, аналогичным образом возрастает экспрессия  $\alpha$ -AR и в сосудах алкоголизованных животных.

Напротив, гиперчувствительность к действию ET1 изолированных колец аорты стрессированных и алкоголизованных крыс сохраняется в условиях сниженного уровня экспрессии ETA-R, посредством которых реализуется вазоконстрикторный эффект ET1 (рис. 1 и 4, А). Реакция сосудов определяется соотношением активностей рецепторов ETA/ETB. Дисбаланс этих рецепторов в пользу ETA является патогенетическим фактором развития гипертензии. Ранее было установлено, что потребление этанола

в течение 2—10 нед. приводит к увеличению силы ET1-индуцированного сокращения сосудов, при этом уровень мРНК для ETA- и ETB-рецепторов оставался неизменным. Однако в эндотелиальных клетках уменьшалось содержание вазодилаторных ETB-R [22]. Это позволило авторам предположить, что потребление этанола приводит к дисбалансу на уровне соотношения ETA- и ETB-рецепторов в пользу первых. В наших исследованиях принудительную алкоголизацию крыс осуществляли в течение 28 нед., что, несомненно, должно приводить к более негативным последствиям, о чем свидетельствуют полученные нами данные о снижении уровня экспрессии ETA-R. Вероятно, длительное потребление этанола еще в большей степени угнетает синтез и ETB-R, поскольку, как было отмечено выше, уже через 2 нед. потребления этанола уменьшается содержание этих рецепторов [22]. Кроме того, под влиянием этанола увеличение ET1-индуцированного сокращения аорты крыс при сниженной экспрессии ETA-R могло быть обусловлено активацией Rho-киназного сигнального каскада, а также накоплением активных форм кислорода в ГМК.

Известно, что стресс и хроническое потребление этанола вызывают активацию ренин-ангиотензиновой системы [34]. Нами впервые установлено, что сосуды, извлеченные из организма крыс, подвергнутых длительному воздействию легкого стресса, вызванного изоляцией животных, гипореактивны по отношению к вазоконстрикторному действию AVP и АПІ. Аналогичные результаты получены и на сосудах алкоголизованных и находящихся в состоянии абстиненции животных. Основным компонентом ренин-ангиотензиновой системы является АПІ, вазоконстрикторный эффект которого реализуется через локализованные в ГМК рецепторы АТ1-типа. В эндотелиальных клетках сосудов экспрессируются АТ1- и АТ2-рецепторы, которые контролируют секрецию эндотелий-расслабляющих факторов. Сигнализация от этих рецепторов носит антагонистичную направленность по отношению друг к другу [35]. В норме, преобладает вазоконстрикторный эффект АТІ [36, 37]. Хроническое потребление этанола вызывает активацию данной эндокринной системы [34]. Установлено, что через 6 нед. потребления этанола (20% в/в) в плазме повышается активность ренина, ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), возрастает уровень АТІ, АТІІ и альдостерона [23]. Вместе с тем, потребление этанола не влияет на активность АПФ и уровни АТІ и АТІІ в аорте и брыжеечной артерии крыс, а также не изменяет экспрессию рецепторных белков и АПФ [24]. Судя по результатам этих исследований, в сосудах алкоголизованных животных не возрастает активность локальной ре-

нин-ангиотензиновой системы. По мнению авторов, при хроническом потреблении этанола повышение артериального давления может быть обусловлено АТ1А-индуцированным накоплением активных форм кислорода и снижением биодоступности оксида азота.

Следует подчеркнуть, что в упомянутых выше работах период принудительной алкоголизации крыс составлял 6 нед., в то время как в наших исследованиях — 24—28 нед., что существенным образом могло отразиться на характере изменений функциональной активности и экспрессии АТ1А-*R* V1А-*R* в сосудах и развитии гипореактивности по отношению к действию АVP и АТII. Так, в исследованиях Наттона и соавт. [32] установлено, что у крыс, потреблявших 36% раствор этанола в течение 18 нед., снижается систолическое давление. При этом у алкоголизованных животных прессорная реакция на внутривенное введение NA не изменяется, но значительно снижается в ответ на введение АТII. Мы предположили, что выявленные нами изменения реактивности сосудов развиваются по глюкокортикоид-зависимому механизму.

Основной гормональной системой ответа организма на стресс является гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось, ответственная за выработку стресс-гормонов. Изменения в регуляции данной системы и стресс являются факторами риска развития алкогольной зависимости [38, 39]. Исследования показали, что кортизол, влияя на различные структуры мозга, может усиливать негативное влияние алкоголя на когнитивное поведение и провоцировать рецидивы его потребления [40]. Полагают, что активация цитозольных GR в мозге способствует нейроадаптации к воздействию этанола и развитию зависимости [41, 42]. Показано, что под влиянием этанола в префронтальной коре, прилежащем ядре и ядре ложа конечной полоски снижается уровень экспрессии GR, в то время как в амигдале и гиппокампе он остается неизменным [43]. В стадии абстиненции, напротив, до нормальных величин возрастает сниженный уровень экспрессии GR в перечисленных структурах мозга и статистически достоверно повышается в других. Эти результаты позволили авторам предположить, что GR являются посредником этанол-индуцированной нейротоксичности в мозге и развитии алкогольной зависимости.

При остром и хроническом потреблении этанола, а также при абстинентном синдроме у человека и экспериментальных животных в плазме значительно увеличен уровень глюкокортикоидных гормонов [44—46]. Главная роль в реализации эффекта глюкокортикоидов принадлежит GR. Являясь фактором транскрипции, они способны как активировать, так и подавлять экспрессию генов рецепторных белков и

ферментов. Под их влиянием усиливается транскрипция генов для V1А-, АТ1А- и ЕТА-рецепторов и подавляется для ЕТВ- и 5НТ1А-рецепторов [47-51]. При длительном снижении содержания GR нарушается глюкокортикоидзависимый синтез этих белков. Ранее нами была установлена прямая зависимость между силой вызванного АVP или АТII сокращения изолированных колец аорты, уровнем экспрессии рецепторов V1А- и АТ1А-типа, с одной стороны, и содержанием мРНК для GR в сосудах, с другой. Так, при активации GR путем инкубации сосудов в течение 24 ч с дексаметазоном в 2 и 3 раза по сравнению с контролем усиливается вазоконстрикторная реакция сосудов в ответ на воздействие АТII или АVP, но не NA, ЕТ1, 5НТ, и эти изменения были обусловлены выраженным дексаметазон-индуцированным увеличением экспрессии V1А- и АТ1А-рецепторов [52]. Напротив, десенситизация GR длительным введением крысам больших доз дексаметазона приводит к снижению содержания мРНК для GR, V1А- и АТ1А-рецепторов и уменьшению силы сокращения изолированных колец аорты в ответ на воздействие АТII и АVP [53, 54].

Аналогичное снижение уровня экспрессии GR, V1А- и АТ1А-рецепторов выявлено и в сосудах алкоголизованных и стрессированных крыс. Наиболее значительным было снижение содержания мРНК для V1А- и АТ1А-рецепторов. С учетом данных литературы и результатов собственных исследований есть основания полагать, что развитие гипореактивности сосудов стрессированных, алкоголизованных или находящихся в состоянии абстиненции крыс по отношению к АVP или АТII обусловлено снижением экспрессии генов, ответственных за синтез рецепторных белков. Основной причиной развития этого процесса является снижение функциональной активности GR, которое может быть обусловлено как уменьшением уровня экспрессии этих рецепторов, о чем свидетельствуют результаты настоящего исследования, так и их истощением, вызванным высоким уровнем глюкокортикоидных гормонов в плазме стрессированных и алкоголизованных животных. Кроме того, мы полагаем, что нарушение регуляции тонуса сосудов на уровне межрецепторного взаимодействия GR, V1А- и АТ1А-рецепторов вызваны стрессом или стрессом в сочетании с этанолом, но не отдельно этанолом. В работе и соавт. [20] показано, что содержание кортикостерона в плазме крыс возрастает при стрессе и при его сочетании с алкоголем, в то время как при потреблении одного этанола остается неизменным. Тем не менее, в исследованиях, проводимых на добровольцах, установлено, что уровень кортизола на стресс в большей степени возрастает у лиц, потребляющих большие дозы алкоголя, чем у умеренно потребляющих лиц (3,5 и

0,7 нмоль/л соответственно) [30]. Все это свидетельствует о сложных механизмах негативного влияния алкоголя на функцию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая оси и их последствий на уровне центральной нервной системы и периферических тканей.

Впервые выявлено негативное влияние этанола на серотонинергическую регуляцию тонуса кровеносных сосудов, о чем свидетельствует подавление сократительного ответа изолированных колец аорты в ответ на воздействие низких и средних концентрация 5HT. Через 1мес после отмены приема этанола наблюдалась тенденция к относительной нормализации 5HT-индуцированного сокращения (рис. 1). Следует подчеркнуть, что с увеличением продолжительности жизни животных и при длительном воздействии изоляционного стресса, напротив, развивается гиперреактивность сосудов по отношению к действию данного моноамина. Роль центральной серотонинергической системы в механизмах формирования алкогольной зависимости и абстинентного синдрома изучена относительно хорошо [8, 55—58]. Полагают, что негативное влияние алкоголя на важнейшие нейромедиаторные системы мозга и нарушение когнитивных функций реализуется через серотониновые рецепторы 5HT<sub>3</sub>-, 5HT<sub>1A</sub>- и 5HT<sub>2A/2C/2B</sub>-типа, а также через 5HT-транспортер.

Влияние этанола на функцию серотонинергической системы в периферических тканях, в том числе в сосудах, изучено в меньшей степени. В экспериментах на изолированной хвостовой артерии крыс показано, что этанол в концентрации 0,03 М усиливает, в концентрации 0,1 М — не изменяет чувствительность сосудов к действию 5HT, а в концентрации 0,3 М ингибирует 5HT-индуцированное сокращение. Кроме того, сосуды, извлеченные из организма крыс после однократного приема этанола (2 г/кг), были менее чувствительны к действию 5HT [59]. Пока неясен механизм этого феномена. Традиционно считается, что вазоконстрикторный эффект 5HT реализуется, главным образом, через 5HT<sub>2A</sub>-рецепторы. Судя по результатам исследования, уровень экспрессии этих рецепторов в сосудах, извлеченных из организма алкоголизованных животных в период отмены этанола, существенно не изменяется (рис. 3). Однако в этих сосудах почти в 2 раза увеличивается содержание мРНК для 5HT<sub>2B</sub>-рецепторов. Ранее нами было показано, что воздействие агониста 5HT<sub>2B</sub>-рецепторов BW 723C86 на предсокращенные сосуды приводит к их расслаблению [60, 61]. Однако до сих пор нет четкого представления о механизмах его релаксирующего действия, как и нет единого мнения о функциональной роли 5HT<sub>2B</sub>-рецепторов в кровеносных сосудах. Судя по данным литературы, важнейшая функция этих рецепторов заклю-

чатся в их модулирующем влиянии на активность 5HT-транспортера (5HTT). Многие ингибиторы 5HTT обладают агонистической активностью по отношению к 5HT<sub>2B</sub>-R [62, 63]. Ранее мы показали, что ингибиторы 5HT-транспортера значительно уменьшают прирост силы сокращения аорты крыс, вызванный действием 5HT, и расслабляют предсокращенные сосуды аналогично тому, как это наблюдается при воздействии на них агониста 5HT<sub>2B</sub>-R BW 723C86. В качестве гипотезы можно предположить, что под влиянием алкоголя нарушается функция 5HT-транспортера, что приводит к уменьшению поступления моноамина в клетку и угнетению рецептор-независимых механизмов регуляции сократимости ГМК сосудов. И к этому процессу, по-видимому, причастны 5HT<sub>2B</sub>-R, поскольку только в сосудах алкоголизованных животных в стадии абстиненции наблюдается двукратное увеличение содержания мРНК для этих рецепторов. Однако для подтверждения данной гипотезы необходимо продолжить исследования в данном направлении, а также исследовать причастность других типов 5HT-рецепторов к развитию гипореактивности сосудов к действию серотонина.

## Заключение

Таким образом, у крыс с дилатационной алкогольной кардиомиопатией развиваются различные по степени выраженности и направленности изменения реактивности сосудов по отношению к эндогенным вазоконстрикторным соединениям. Полученные данные свидетельствуют о том, что важнейшим патогенетическим звеном нарушения нейроэндокринной регуляции сосудистого тонуса при хроническом алкоголизме в сочетании со стрессом является выявленное в наших исследованиях угнетение экспрессии и функциональной активности глюкокортикоидных рецепторов в сосудах. GR положительно регулируют транскрипцию многих рецепторных и регуляторных белков, в том числе AT<sub>1A</sub>-R, ангиотензинпревращающего фермента и V<sub>1A</sub>-R. Поэтому мы полагаем, что развитие гипореактивности к действию АТII и АVP и снижение экспрессии AT<sub>1A</sub>-R и V<sub>1A</sub>-R в сосудах стрессированных и алкоголизованных животных является GR-зависимым процессом. Не исключено, что уменьшение уровня мРНК для ETA-R также обусловлено сниженной активностью GR.

Особый интерес представляют данные о влиянии этанола на серотонинергическую регуляцию сократимости сосудов. Из всех рассмотренных в настоящем исследовании систем, участвующих в регуляции тонуса кровеносных сосудов, этанол сам по себе избирательно угнетает 5HT-индуцированное сокращение

изолированных колец аорты крыс. И это при том, что с увеличением продолжительности жизни, а также под влиянием стресса, которому животные подвергались в процессе моделирования алкогольной кардиомиопатии, напротив, увеличивается чувствительность сосудов к действию 5НТ. Понять механизмы, лежащие в основе этого процесса, нам представляется крайне важным. Результаты собственных исследований, а также данные литературы, позволяют предположить, что выявленные нарушения нейроэндокринной регуляции развиваются не только в аорте, но и в других сосудах, что может быть одним из механизмов развития полиорганной патологии при хроническом алкоголизме, в том числе способствовать развитию кардиомиопатии. Очевидно, что в настоящее время выявлена лишь малая часть патогенетических механизмов действия этанола на функцию многих систем и органов и для ответа на многие вопросы требуется большая и многоплановая работа.

Работа выполнена при поддержке РФФИ проект № 13-04-00464.

## References

- Lian C. L'alcolisme cause d'hypertension arterielle. *Bull Acad. Natl. Med.* 1915; 74: 525-8.
- Dyer A.R., Stamler J., Paul O., Berkson D.M., Lepper M.H., McKean H. et al. Alcohol consumption, cardiovascular risk factors, and mortality in two Chicago epidemiologic studies. *Circulation.* 1977; 56: 1067-74.
- Arkwright P.D., Beilin L.J., Rouse I., Armstrong B.K., Vandongen R. Effects of alcohol use and other aspects of lifestyle on blood pressure levels and prevalence of hypertension in a working population. *Circulation.* 1982; 66: 60-6.
- Friedman G.D., Klatsky A.L., Siegelau A.B. Alcohol intake and hypertension. *Ann Intern. Med.* 1983; 98: 846-9.
- Soardo G., Donnini D., Varutti R., Milocco C., Basan L., Esposito W. et al. Effects of alcohol withdrawal on blood pressure in hypertensive heavy drinkers. *J. Hypertens.* 2006; 24(8): 1493-8.
- Ginter E., Simko V. Alcoholism: recent advances in epidemiology, biochemistry and genetics. *Bratisl. Lek. Listy.* 2009; 110(5): 307-11.
- Costin B.N., Miles M.F. Molecular and neurologic responses to chronic alcohol use. *Handb. Clin. Neurol.* 2014; 125: 157-71.
- Kenna G.A. Medications acting on the serotonergic system for the treatment of alcohol dependent patients. *Curr. Pharm. Des.* 2010; 16(19): 2126-35.
- Sari Y., Johnson V.R., Weedon J.M. Role of the serotonergic system in alcohol dependence: from animal models to clinics. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2011; 98: 401-43.
- Sari Y. Role of 5-hydroxytryptamine 1B (5-HT<sub>1B</sub>) receptors in the regulation of ethanol intake in rodents. *J. Psychopharmacol.* 2013; 27(1): 3-12.
- Stewart A., Maity B., Anderegg S.P., Allamargot C., Yang J., Fisher R.A. Regulator of G protein signaling 6 is a critical mediator of both reward-related behavioral and pathological responses to alcohol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2015; 112(7): E786-95.
- Wakabayashi I., Hatake K. Effects of ethanol on the nervous and vascular systems: the mechanisms of alcohol-induced hypertension. *Nihon Eiseigaku Zasshi.* 2001; 55(4): 607-617.
- Kudo R., Hatake K. Effect of ethanol on nerve dependent vasorelaxation and vasoconstriction. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi.* 2011; 46(2): 241-9.
- Ceron C.S., Marchi K.C., Muniz J.J., Tirapelli C.R. Vascular oxidative stress: a key factor in the development of hypertension associated with ethanol consumption. *Curr. Hypertens Rev.* 2014; 10(4): 213-22.
- Marchi K.C., Muniz J.J., Tirapelli C.R. Hypertension and chronic ethanol consumption: What do we know after a century of study? *World J. Cardiol.* 2014; 6(5): 283-94.
- Tirapelli C.R., Al-Khoury J., Bkaily G., D'Orleans-Juste P., Lanchote V.L., Uyemura S.A., de Oliveira A.M. Chronic ethanol consumption enhances phenylephrine-induced contraction in the isolated rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006; 316(1): 233-41.
- Tirapelli C.R., Leone A.F., Coelho E.B., Restel L.B., Correa F.M., Lanchote V.L. et al. Effect of ethanol consumption on blood pressure and rat mesenteric arterial bed, aorta and carotid responsiveness. *J. Pharm. Pharmacol.* 2007; 59(7): 985-93.
- Utkan T., Yildiz F., Ilbay G., Ozdemirci S., Erden B.F., Gacar N., Ulak G. Blood pressure and vascular reactivity to endothelin-1, phenylephrine, serotonin, KCl and acetylcholine following chronic alcohol consumption in vitro. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2001; 15(3): 157-65.
- Sahna E., Kurcer Z., Ozturk F., Cengiz N., Vardi N., Birincioglu M., Olmez E. Effects of chronic ethanol consumption on alpha-adrenergic-induced contractions and endothelium-dependent relaxations in rat thoracic aorta. *Pharmacol. Res.* 2000; 41(6): 629-33.
- Baptista Rde F., Taiepeiro Ede F., Queiroz R.H., Chies A.B., Cordellini S. Stress alone or associated with ethanol induces prostanoid release in rat aorta via alpha2-Adrenoceptor. *Arq. Bras. Cardiol.* 2014; 102(3): 211-8.
- Leite L.N., Lacchini R., Carnio E.C. Queiroz R.H., Tanus-Santos J.E., de Oliveira A.M., Tirapelli C.R. Ethanol consumption increases endothelin-1 expression and reactivity in the rat cavernosal smooth muscle. *Alcohol Alcohol.* 2013; 48(6): 657-66.
- Tirapelli C.R., Casolari D.A., Montezano A.C., Yogi A., Tostes R.C., Legros E. et al. Ethanol consumption enhances endothelin-1-induced contraction in the isolated rat carotid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006; 318(2): 819-27.
- Baptista Rde F., Chies A.B., Taiepeiro Ede F., Cordellini S. Endothelial AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> pathways in aortic responses to angiotensin II after stress and ethanol consumption in rats. *Stress.* 2014; 17(6): 512-9.
- Passaglia P., Ceron C.S., Mecawi A.S., Antunes-Rodrigues J., Coelho E.B., Tirapelli C.R. Angiotensin type 1 receptor mediates chronic ethanol consumption-induced hypertension and vascular oxidative stress. *Vascul. Pharmacol.* 2015; S1537-1891(15)00071-3. [Epub ahead of print].
- Kryzhanovskii S.A., Tsorin I.B., Kolik L.G., Stolyaruk V.N., Vititnova M.B., Ionova E.O., Durnev A.V., Sereidenin S.B. Translational Model alcoholic cardiomyopathy. *Molekulyarnaya Meditsina.* 2015; 1: 40-7. (in Russian)
- Kozhevnikova L.M., Avdonin P.V. Disturbances in hormonal regulation of vascular tone during traumatic shock. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2006; 141(5): 511-4. (in Russian)

27. Perreira K.M., Sloan F.A. Life events and alcohol consumption among mature adults: A longitudinal analysis. *Journal of Studies on Alcohol*. 2001; 62(4): 5018.
28. Norman K.J., Seiden J.A., Klickstein J.A., Han X., Hwa L.S., DeBold J.F., Miczek K.A. Social stress and escalated drug self-administration in mice I. Alcohol and corticosterone. *Psychopharmacology (Berl)*. 2015; 232(6): 991-1001.
29. Toda N., Ayajiki K. Vascular actions of nitric oxide as affected by exposure to alcohol. *Alcohol*. 2010; 45(4): 347-55.
30. Jones A., McMillan M.R., Jones R.W., Kowalik G.T., Steeden J.A., Pruessner J.C. et al. Habitual alcohol consumption is associated with lower cardiovascular stress responses—a novel explanation for the known cardiovascular benefits of alcohol? *Stress*. 2013; 16(4): 369-76.
31. Steffens A.A., Moreira L.B., Fuchs S.C., Wiehe M., Gus M., Fuchs F.D. Incidence of hypertension by alcohol consumption: is it modified by race? *J. Hypertens*. 2006; 24(8): 1489-92.
32. Hatton D.C., Bukoski R.D., Edgar S., McCarron D.A. Chronic alcohol consumption lowers blood pressure but enhances vascular contractility in Wistar rats. *J. Hypertens*. 1992; 10(6): 529-37.
33. Kleinhenz D.J., Sutliff R.L., Polikandriotis J.A., Walp E.R., Dikalov S.I., Guidot D.M., Hart C.M. Chronic ethanol ingestion increases aortic endothelial nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in the rat. *Alcohol Clin. Exp. Res*. 2008; 32(1): 148-54.
34. Husain K., Ansari R.A., Ferder L. Alcohol-induced hypertension: Mechanism and prevention. *World J. Cardiol*. 2014; 6(5): 245-52.
35. Rush J.W., Aultman C.D. Vascular biology of angiotensin and the impact of physical activity. *Appl. Physiol. Nutr. Metab*. 2008; 33(1): 162-72.
36. Munzenmaier D.H., Greene A.S. Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension*. 1996; 27(3): 760-5.
37. MacKenzie A. Endothelium-derived vasoactive agents, AT1 receptors and inflammation. *Pharmacol. Ther*. 2011; 131(2): 187-203.
38. Schepis T.S., Rao U., Yadav H., Adinoff B. The limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the development of alcohol use disorders in youth. *Alcohol Clin. Exp. Res*. 2011; 35(4): 595-605.
39. Stephens M.A., Wand G. Stress and the HPA axis: role of glucocorticoids in alcohol dependence. *Alcohol Res*. 2012; 34(4): 468-83.
40. Wand G. The influence of stress on the transition from drug use to addiction. *Alcohol Res. Health*. 2008; 31(2): 119-36.
41. Sharrett-Field L., Butler T.R., Berry J.N., Reynolds A.R., Prendergast M.A. Mifepristone pretreatment reduces ethanol withdrawal severity in vivo. *Alcohol Clin. Exp. Res*. 2013; 37(8): 1417-23.
42. Cipitelli A., Damadzic R., Hamelink C., Brunquell M., Thorsell A., Heilig M., Eskay R.L. Binge-like ethanol consumption increases corticosterone levels and neurodegeneration whereas occupancy of type II glucocorticoid receptors with mifepristone is neuroprotective. *Addic. Biol*. 2014; 19(1): 27-36.
43. Vendruscolo L.F., Barbier E., Schlosburg J.E., Misra K.K., Whitfield T.W. Jr., Logrip M.L. et al. Corticosteroid-dependent plasticity mediates compulsive alcohol drinking in rats. *J. Neurosci*. 2012; 32(22): 7563-71.
44. Rasmussen D.D., Boldt B.M., Bryant C.A., Mitton D.R., Larsen S.A., Wilkinson C.W. Chronic daily ethanol and withdrawal: 1. Long-term changes in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Alcohol Clin. Exp. Res*. 2000; 24(12): 1836-49.
45. Soardo G., Donnini D., Varutti R., Milocco C., Basso L., Esposito W. et al. Effects of alcohol withdrawal on blood pressure in hypertensive heavy drinkers. *J. Hypertens*. 2006; 24(8): 1493-8.
46. Reynolds A.R., Saunders M.A., Brewton H.W., Winchester S.R., Elgumati I.S., Prendergast M.A. Acute oral administration of the novel, competitive and selective glucocorticoid receptor antagonist ORG 34517 reduces the severity of ethanol withdrawal and related hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation. *Drug Alcohol Depend*. 2015; 154: 100-4.
47. Murasawa S., Matsubara H., Kizima K., Maruyama K., Mori Y., Inada M. Glucocorticoids regulate V1a vasopressin receptor expression by increasing mRNA stability in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 1995; 26(4): 665-9.
48. Murasawa S., Matsubara H., Kanasaki M., Kijima K., Maruyama K., Nio Y. et al. Characterization of glucocorticoid response element of rat angiotensin II type 1A receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1995; 209(3): 833-40.
49. Borcsok I., Schairer H.U., Sommer U., Wakley G.K., Schneider U., Geiger F. et al. Glucocorticoids regulate the expression of the human osteoblastic endothelin A receptor gene. *J. Exp. Med*. 1998; 188(9): 1563-73.
50. Wissink S., Meijer O., Pearce D., van Der Burg B., van Der Saag P.T. Regulation of the rat serotonin-1A receptor gene by corticosteroids. *J. Biol. Chem*. 2000; 275(2): 1321-6.
51. Zhang X., Clark A.F., Yorio T. Interactions of endothelin-1 with dexamethasone in primary cultured human trabecular meshwork cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2003; 44(12): 5301-8.
52. Kozhevnikova L.M., Sukhanova I.F., Avdonin P.V. Changes in the contractile properties and expression AT1A-receptors of angiotensin II in the rat aorta depending to the functional activity of the glucocorticoid receptors. *Patogenez*. 2008; 6(4): 53-7. (in Russian)
53. Golikov P.P., Kozhevnikova L.M., Arkhipenko Iu.V., Nikolaeva N.Iu. Receptor mechanisms for realizing the effect of glucocorticoid hormones in traumatic and hemorrhagic shock. *Vestnik Rossiyskoy AMN*. 2001; 12: 23-9. (in Russian)
54. Kozhevnikova L.M., Avdonin P.P., Sukhanova I.F., Avdonin P.V. The role of desensitization of glucocorticoid receptors in the development of vascular resistance to endogenous vasoconstrictors in traumatic shock. *Vestnik Rossiyskoy AMN*. 2007; 6: 3-8. (in Russian)
55. Johnson B.A. Role of the serotonergic system in the neurobiology of alcoholism: implications for treatment. *CNS Drugs*. 2004; 18(15): 1105-18.
56. Budde H., Sander T., Wernicke C., Muller A., Gallinat J., Schmidt L.G., Smolka M.N. Serotonin transporter promoter polymorphism and dopaminergic sensitivity in alcoholics. *J. Neural. Transm*. 2010; 117(1): 133-8.
57. Kasper J., Tikamdas R., Kim M.S., Macfadyen K., Aramini R., Ladd J. et al. The serotonin-2 receptor modulator, (-)-trans-PAT, decreases voluntary ethanol consumption in rats. *Eur. J. Pharmacol*. 2013; 718(1-3): 98-104.
58. Marcinkiewicz C.A., Dorrier C.E., Lopez A.J., Kash T.L. Ethanol induced adaptations in 5-HT2c receptor signaling in the bed nucleus of the stria terminalis: implicati-



ons for anxiety during ethanol withdrawal. *Neuropharmacology*. 2015; 89: 157-67.

59. Malinowska B., Pietraszek M., Chabielska E., Pawlak D., Buczko W. The effect of ethanol and serotonin on blood vessels of the rat. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 1990; 42(4): 333-42.

60. Kozhevnikova L.M., Avdonin P.V. Agonist of serotonin 5HT1A-receptors 8-OH-DPAT increases the force of contraction of rat aorta and mesenteric artery in the presence of endothelin-1 or vasopressin and causes relaxation of the vessels precontracted with noradrenaline. *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.* 2010; 1: 44-53. (in Russian)

61. Terekhina I.L., Nadeev A.D., Kozhevnikova L.M., Goncharov N.V., Avdonin P.V. 5HT1B- and 5HT2B-receptors of serotonin stimulate increase in cytoplasmic calcium

concentration in vascular endothelial cells. *Patogenez*. 2012; 10(1): 69-71. (in Russian)

62. Li B., Zhang S., Zhang H., Nu W., Cai L., Hertz L., Peng L. Fluoxetine-mediated 5-HT 2B receptor stimulation in astrocytes causes EGF receptor transactivation and ERK phosphorylation. *Psychopharmacology (Berl.)*. 2008; 201(3): 443-58.

63. Peng L., Gu L., Li B., Hertz L. Fluoxetine and all other SSRIs are 5-HT2B Agonists — Importance for their Therapeutic Effects. *Curr. Neuropharmacol.* 2014; 12(4): 365-79.

Поступила 02.11.15

#### Сведения об авторах:

Цорин Иосиф Борисович (Tsorin I.B.), доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. фармакологического скрининга

Варков Александр Иванович (Varkov A.I.), канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. фармакологического скрининга

Столярук Валерий Николаевич (Stolyaruk V.N.), канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. фармакологического скрининга

Вититнова Марина Борисовна (Vititnova M.B.), канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. фармакологического скрининга

Коллик Лариса Геннадьевна (Kolik L.G.), доктор биол. наук, зав. лаб. фармакологической регуляции состояний зависимости

Суханова Ирина Федоровна (Sukhanova I.F.), канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. физиологии рецепторов и сигнальных систем, ИБР им. Н.К. Кольцова РАН

Крыжановский Сергей Александрович (Kryzhanovskii S.A.), доктор мед. наук, зав. лаб. фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», e-mail: SAK-538@yandex.ru

Скальный А.А.<sup>1,4</sup>, Тиньков А.А.<sup>2,3,4</sup>, Медведева Ю.С.<sup>5</sup>, Алчинова И.Б.<sup>5</sup>,  
Бонитенко Е.Ю.<sup>1</sup>, Карганов М.Ю.<sup>5</sup>, Никоноров А.А.<sup>2</sup>

## **Состояние гомеостаза цинка и показатели мышечной деятельности при экспериментальной дозированной физической нагрузке на фоне введения аспарагината цинка**

<sup>1</sup> — ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», 192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1

<sup>2</sup> — ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, 460000, г.Оренбург, ул. Советская, д. 6

<sup>3</sup> — ГОУ ВПО «Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова», 150000, г.Ярославль, ул. Советская, д. 14

<sup>4</sup> — АНО «Центр биотической медицины», 105064, Москва, ул. Земляной вал, д. 46

<sup>5</sup> — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

*Исследовалось влияние регулярной (в течение 7 и 14 сут.) десятиминутной дозированной физической нагрузки изолированно и на фоне интрагастрального введения 5 и 15 мг/кг аспарагината цинка на распределение данного металла в органах и тканях экспериментальных животных и такие показатели мышечной деятельности, как уровень лактата, креатинина и креатинкиназы (ЕС 2.7.3.2.) сыворотки крови. Показано, что дозированная физическая нагрузка в течение 14 сут. вызывает более выраженное изменение гомеостаза Zn, по сравнению с 7 сут., выражающееся в повышении его уровня в почках, сыворотке, печени, скелетной мускулатуре и шерсти животных. Введение аспарагината цинка сопровождалось повышением его содержания в печени, почках, шерсти и сыворотке, но не скелетной и сердечной мышце. Сочетание физической нагрузки и введения цинка позитивно сказывалось как на гомеостазе Zn, так и показателях мышечной деятельности. Делается заключение о протективном эффекте аспарагината цинка при дозированной физической нагрузке в эксперименте.*

**Ключевые слова:** цинк, физическая нагрузка, лактат, креатинин, креатинкиназа.

**Для цитирования:** Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015; 59(4): 58-65

Skalny A.A.<sup>1,4</sup>, Tinkov A.A.<sup>2,3,4</sup>, Medvedeva Yu.S.<sup>5</sup>, Alchinova I.B.<sup>5</sup>,  
Bonitenko E.Yu.<sup>1</sup>, Karganov M.Yu.<sup>5</sup>, Nikonorov A.A.<sup>2</sup>

## **Zinc homeostasis and indicators of muscle activity in experimental graduated exercise on the background of zinc asparaginate**

<sup>1</sup> — Institute of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency, 192019, St. Petersburg, Russia, Bekhterev st, 1

<sup>2</sup> — Orenburg State Medical University, 460000, Orenburg, Russia, Sovetskaya st. 6

<sup>3</sup> — P.G. Demidov Yaroslavl State University, 150000, Russia, Yaroslavl, ul. Sovetskaya, 10

<sup>4</sup> — ANO «Center for Biotic Medicine», 105064, Moscow, Russia, Zemlyanoy val, 46

<sup>5</sup> — Institute of General Pathology and Pathophysiology, 125315, Moscow, Russia, Baltiyskaya st., 8

*The influence of a regular (for 7 and 14 days) 10-minute dosed exercise in isolation and on the background of intragastric administration of 5 and 15 mg/kg of zinc (II) asparaginate on the distribution of this metal in the organs and tissues of experimental animals and the indicators of muscle activity such as the level of lactate, creatinine and creatine kinase (EC 2.7.3.2.) serum were studied. It has been shown that exercise stress for 14 days causes a more pronounced change in homeostasis Zn, compared with 7 day, it is reflected in increased levels in the kidney, serum, liver, skeletal muscle and fur animals. It has been shown that graduated exercise for 14 days causes a more pronounced change in Zn homeostasis, compared with 7 day that expressed in increased its levels in the kidney, serum, liver, skeletal muscle and fur animals. Introduction zinc (II) asparaginate accompanied by an increase of its content in the liver, kidneys, hair and serum, but not skeletal and cardiac muscle. The combination of physical activity and the introduction of zinc positive effect on homeostasis of Zn, and the terms of muscle activity. The protective effect of zinc asparaginate with graduated exercise in the experiment was concluded.*

**Key words:** zinc, physical activity, lactate, creatinine, creatine kinase.

**For citation:** *Patologicheskaya Fiziologiya I eksperimentalnaya terapiya. 2015; 59(4): 58-65*

**For correspondence:** *Tinkov A.A., e-mail: tinkov.a.a@gmail.com*

**Для корреспонденции:** Тиньков Алексей Алексеевич (Tinkov A.A.), канд. мед. наук, ассистент каф. биологической химии ГБОУ ВПО ОрГМУ Минздрава России, инженер-исследователь УНИ ГБОУ ВПО ЯрГУ им. П.Г. Демидова, e-mail: tinkov.a.a@gmail.com  
**Для корреспонденции:** Скальный Андрей Анатольевич, врач АНО Центр биотической медицины, e-mail: andrey\_sk@microelements.ru

Минеральные добавки часто используются при интенсивной физической нагрузке с целью повышения выносливости и продуктивности [1]. При этом различные соединения цинка являются одними из наиболее часто используемых препаратов [2]. В то же время, данные о влиянии дополнительного введения цинка в организм, подверженный физической нагрузке, на физиологические показатели немногочисленны и противоречивы [3]. Более того, имеются противоречия по поводу влияния физической активности на гомеостаз цинка в организме [4—6]. В связи с этим, целью настоящего исследования явилось изучение влияния введения аспарагината цинка на фоне физической нагрузки на содержание металла в тканях организма и биохимические параметры мышечной деятельности у крыс Wistar.

### Материалы и методы

Настоящее исследование проведено на 72 крысах-самцах линии Wistar в соответствии с «Правилами проведения работ и использования экспериментальных животных» и заключением Локального Этического Комитета. Животные содержались в условиях искусственного освещения на стандартном рационе ПК-120 (ООО «Лабораторкорм», Москва) с энергетической ценностью 307 ккал/100 г и содержанием цинка  $78,6 \pm 5,1$  мг/кг. Животные также имели неограниченный доступ к чистой бутилированной воде.

Экспериментальное исследование состояло из 2-й серий опытов по 6 групп животных с длительностью 7 и 14 сут. Животные с низкой и высокой физической нагрузкой (ФН) являлись контрольными. Крысы 2-й и 3-й групп получали 5 (Zn5) и 15 (Zn15) мг/кг/сут. аспарагината цинка внутрижелудочно на фоне низкой физической активности. Животные 5-й и 6-й групп получали соответствующие дозы аспарагината цинка на фоне интенсивной физической нагрузки (ФН + Zn5 и ФН + Zn15 соответственно). Внутрижелудочное введение препарата ( $Zn(C_4NO_4H_6)_2 \cdot Zn(OH)_2$ ) в крахмальной взвеси осуществлялось с помощью силиконового катетера. Физическая нагрузка создавалась ежедневно через 40 мин после внутрижелудочного введения аспарагината цинка путем принудительного бега на тредмиле Animal Treadmill: Exer 3/6 (Columbus instruments, Columbus, OH, USA) в течение 10 мин. По окончании эксперимента у животных производился забор сыворотки крови, шерсти, печени, почек, сердца, и скелетной мышцы (m. gastrocnemius). Полученные образцы использовались для последующего химического анализа с целью определения содержания цинка.

Пробоподготовка образцов включала в себя микроволновое разложение в азотной кислоте в системе Berghof speedwave 4 (20 мин, 180°C). Последующий химический анализ полученных образцов производился методом масс спектрометрии с индуктивно связанной аргонной плазмой на приборе NexION 300D (PerkinElmer), оснащенном автоматическим дозатором ESI SC-2 DX4 (Elemental Scientific Inc.).

Дополнительно для проведения контроля качества использовались сертифицированные референтные образцы биологических сред (образец волос GBW09101; контрольные сыворотки ClinCheck Plasma Control, лот 129, 1 и 2 уровней).

Определение сывороточной концентрации лактата, креатинина, а также активности креатинкиназы осуществлялось с использованием наборов реактивов Randox (Randox Laboratories Ltd.) на автоматическом биохимическом анализаторе Tokyo Boeki (Tokyo Boeki Machinery Ltd).

Статистический анализ данных осуществлялся посредством программного пакета Statistica 10 (StatSoft Inc., 2011). Данные представлены в виде средней арифметической величины и среднеквадратического отклонения, поскольку характер распределения соответствовал нормальному. Для выявления достоверности влияния введения цинка и физической нагрузки на изучаемые параметры использовался многофакторный дисперсионный анализ (factorial ANOVA). По групповое сравнение данных производилось с помощью критерия наименьшей значимости Фишера (Fisher's Least Significant Difference test). Для всех статистических тестов уровень достоверности определялся как  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Данные проведенного исследования свидетельствуют о влиянии введения аспарагината цинка на распределение металла в различных тканях организма лабораторных животных. Так, поступление 5 и 15 мг/кг/сут. аспарагината цинка в течение 7 сут. (рис. 1, А) приводило к повышению уровня цинка в паренхиме печени на 11 и 25%, соответственно, однако статистически значимые изменения отмечались лишь в последнем случае. При этом интенсивная физическая нагрузка не сопровождалась сколько-нибудь значимыми изменениями содержания металла в печени крыс относительно контрольных значений. Стоит отметить, что поступление в организм животных 5 и 15 мг/кг/сут. аспарагината цинка на фоне физической нагрузки приводило к увеличению исследуемого показателя на 14 и 25% относительно соответствующего контроля. Как и у животных с низкой физической активностью, достоверные изменения отмеча-

лись лишь в группе, получающей максимальную дозу цинксодержащей добавки. Результаты многофакторного дисперсионного анализа (рис. 1, а) свидетельствуют о статистически значимом влиянии введения цинка на распределение данного металла в тканях организма, в то время как влияние физической нагрузки приближалось к достоверному. При этом факториальное взаимодействие не оказывало существенного влияния на исследуемый параметр.

Поступление в организм лабораторных животных аспарагината цинка в дозе 15 мг/кг/сут. приводило к увеличению уровня цинка в паренхиме почек (рис. 1, В) на 8% относительно соответствующих значений 1-й и 2-й групп. При этом интенсивная физическая нагрузка вызывала достоверное повышение содержания металла в почке по сравнению с контрольными значениями на 22%. Несмотря на отсутствие выраженных изменений уровня цинка после введение

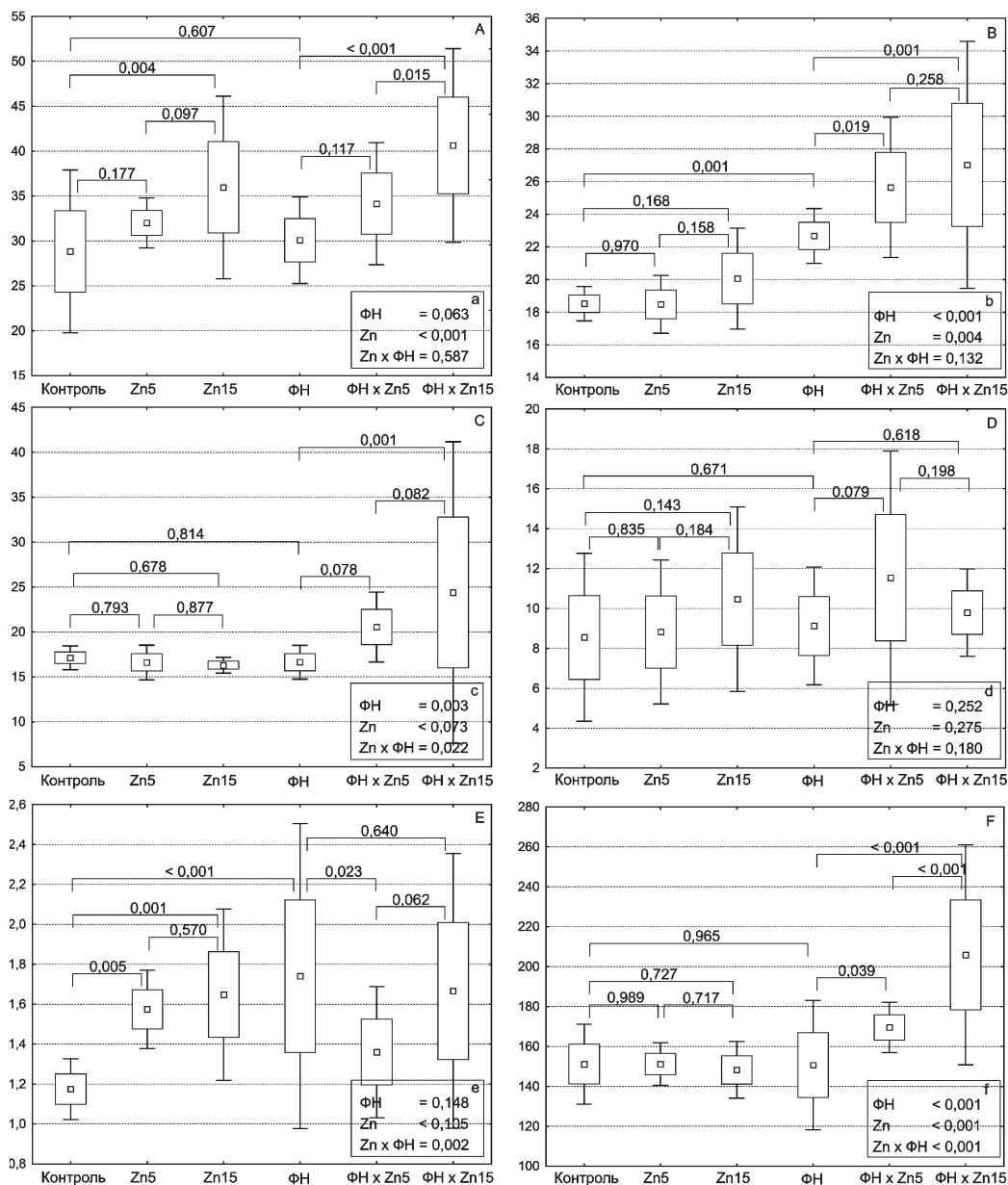


Рис. 1. Влияние физической нагрузки и введения аспарагината цинка в течение 7 суток на содержание металла (мкг/г) в А) печени, В) почке, С) миокарде, D) скелетной мышце, Е) сыворотке крови (мкг/л), F) шерсти лабораторных животных и достоверность погрупповых различий (значения p), а также значимость воздействия факторов на определяемый параметр в а) печени, б) почке, в) миокарде, д) скелетной мышце, е) сыворотке крови, ф) шерсти животных в соответствии с результатами многофакторного дисперсионного анализа (значения p). □ — значение средней (Mean); □ — среднеквадратическое отклонение (SD); | — 2 SD.

исследуемой добавки у животных с низким уровнем активности, поступление цинка на фоне физической нагрузки сопровождалось значительным увеличением значений данного параметра. Так, в частности, введение 5 и 15 мг/кг/сут. аспарагината цинка на фоне физической нагрузки приводило к 13 и 19% повышению концентрации цинка в паренхиме почек относительно соответствующих значений соответствующего контроля с физической нагрузкой. Установлено (рис. 1, б), что как физическая нагрузка, так и введение цинка оказывают достоверное влияние на уровень металла в паренхиме почки. В то же время, многофакторный дисперсионный анализ не выявил значимого влияния факториального взаимодействия на исследуемый параметр.

Уровень цинка в миокарде не подвергался достоверным изменениям под влиянием экзогенного введения аспарагината цинка в течение 7 сут. (рис. 1, с). Физическая нагрузка также не оказывала значимого воздействия на содержание металла в сердечной мышце лабораторных животных. Напротив, внутрижелудочное введение 5 и 15 мг/кг/сут. аспарагината цинка на фоне физической нагрузки приводило к достоверному повышению уровня цинка в миокарде на 24 и 47% относительно значений 4-й группы (контроль-ФН), соответственно. Многофакторный дисперсионный анализ (рис. 1, с) выявил достоверное влияние физической нагрузки на определяемый параметр, в то время как влияние введения цинка лишь приближалось к достоверному. Стоит также отметить, что значения уровня цинка в миокарде были подвержены статистически значимому влиянию факториального взаимодействия ( $Z_n \times \text{ФН}$ ).

Содержание цинка в скелетной мышце оставалось относительно стабильным вне зависимости от физической нагрузки и внутрижелудочного введения цинка в организм (рис. 1, d). Проведение многофакторного дисперсионного анализа (рис. 1, d) также не позволило выявить достоверного влияния отдельных факторов и их взаимодействия.

Внутрижелудочное введение 5 и 15 мг/кг/сут. аспарагината цинка сопровождалось достоверным повышением сывороточной концентрации цинка на 34 и 41% относительно контрольных значений соответственно (рис. 1, e). Интенсивная физическая нагрузка приводила к статистически значимому повышению исследуемого параметра на 49% от контроля. Интересным представляется факт снижения сывороточной концентрации металла в результате его экзогенного введения на фоне физической нагрузки. Так, поступление в организм 5 мг/кг/сут. аспарагината цинка сопровождалось 22% снижением уровня цинка в сыворотке крови лабораторных животных, подверженных физической нагрузке. Несмотря на тот факт, что

изолированные факторы не оказывали достоверного влияния на исследуемый параметр, сывороточная концентрация в значительной степени определялась факториальным взаимодействием (рис. 1, e).

Введение в организм экспериментальных животных исследуемой минеральной добавки не приводило к сколько-нибудь значимым изменениям содержания цинка в шерсти после 7 сут. воздействия (рис. 1, f). Также не было выявлено достоверных различий в значениях данного показателя у крыс с низкой и высокой физической активностью. В то же время, поступление в организм цинка на фоне высокой физической активности приводило к повышению содержания металла в шерсти на 13 и 37% по сравнению с соответствующим контролем (группа 4). Стоит отметить, что в соответствии с результатами многофакторного дисперсионного анализа, как изолированное воздействие факторов, так и их взаимодействие, оказывали достоверное влияние на значения исследуемого показателя (рис. 1, f).

Установлено, что введение 5 и 15 мг/кг/сут. аспарагината цинка животным с низкой физической активностью в течение 14 сут. приводит к повышению уровня металла в паренхиме почек на 18 и 29% соответственно (рис. 2, A). При этом статистически достоверными изменения являлись лишь в 3 группе лабораторных крыс. Интенсивная физическая нагрузка также вызывала достоверное повышение уровня цинка в печени на 46% по сравнению с контрольной группой. Интересно, что поступление цинка на фоне физической нагрузки в составе исследуемого комплекса не приводило к достоверным изменениям концентрации данного элемента в печени. Многофакторный дисперсионный анализ (рис. 2, a) также продемонстрировал достоверное влияние физической нагрузки, но не введения аспарагината цинка, на оцениваемый показатель. Стоит также отметить, что уровень цинка в печени также определялся фактом взаимодействия между факторами (физическая нагрузка, введение цинка).

Характер изменений уровня цинка в паренхиме почек животных был сходен с таковым в печени. Так, в частности, лишь интрагастральное введение 15 мг/кг/сут. сопровождалось достоверным повышением уровня цинка в почке на 29%. Выраженное увеличение содержания металла в почках отмечалось у животных, подверженных интенсивной физической нагрузке, составляя 78% относительно контрольных значений. Введение цинка в организм животных на фоне повышенной физической активности не приводило к увеличению содержания металла в почках. Напротив, поступление 15 мг/кг/сут. на фоне физической активности приводило к снижению уровня микроэлемента на 16% по сравнению с соответствующим контролем (группа 4). Модуль ANOVA выя-

вил достоверное влияние физической нагрузки, а также факториального взаимодействия на уровень цинка в паренхиме почек (рис. 1, b).

Содержание цинка в миокарде лабораторных животных оставалось стабильным после введения аспарагината цинка в обеих исследуемых дозах (рис. 2, С). При этом повышенная физическая нагрузка в течение 14 сут. приводила к достоверному практически двукратному увеличению уровня металла в сердечной мышце. В то же время, дополнительное введение ас-

парагината цинка в дозах 5 и 15 мг/кг/сут. на фоне физической нагрузки сопровождалось снижением содержания цинка в сердце на 22 и 23% относительно соответствующих контрольных значений. В соответствии с результатами многофакторного дисперсионного анализа (рис. 2, с), как изолированные факторы, так и их взаимодействие, оказывало достоверное влияние на определяемый параметр.

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии достоверных различий в содержании цинка в ске-

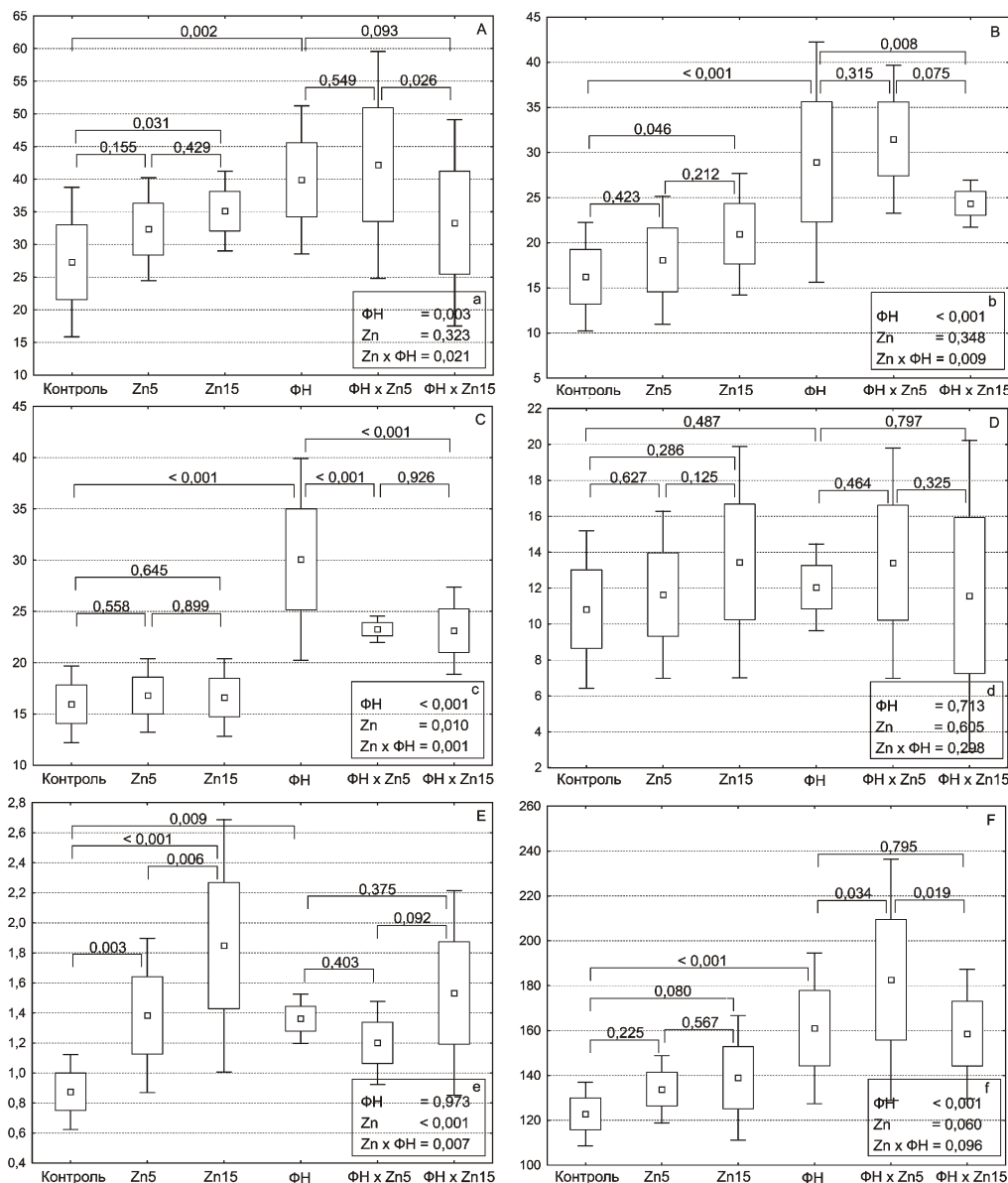


Рис. 2. Влияние физической нагрузки и введения аспарагината цинка в течение 14 сут. на содержание металла (мкг/г) в А) печени, В) почке, С) миокарде, D) скелетной мышце, Е) сыворотке крови (мкг/л), F) шерсти лабораторных животных и достоверность погрупповых различий (значения p), а также значимость воздействия факторов на определяемый параметр в а) печени, б) почке, с) миокарде, d) скелетной мышце, е) сыворотке крови, f) шерсти животных в соответствии с результатами многофакторного дисперсионного анализа (значения p). □ — значение средней (Mean); □ — среднеквадратическое отклонение (SD); | — 2 SD.

летной мускулатуре лабораторных животных, получавших цинк как на фоне низкой, так и на фоне повышенной физической нагрузки (рис. 2, D). Проведение многофакторного дисперсионного анализа также не позволило выявить достоверного влияния факторов на исследуемый параметр (рис. 2, d).

Интрагастральное введение 5 и 15 мг/кг/сут. аспарагината цинка приводило к достоверному повышению сывороточной концентрации микроэлемента на 59 и 113% от контрольных значений, соответственно (рис. 2, E). При этом интенсивная физическая нагрузка в течение 14 сут. вызывала 56% увеличение уровня цинка в сыворотке крови лабораторных животных. В то же время, дополнительное введение цинка на фоне повышенной физической активности не оказывало значимого влияния на исследуемый параметр. Многофакторный дисперсионный анализ (рис. 2, e) продемонстрировал достоверное влияние введения цинка, а также факториального взаимодействия (физическая нагрузка, введение цинка) на сывороточную концентрацию металла.

Несмотря на 8 и 13% увеличение содержания цинка в шерсти животных, получавших 5 и 15 мг/кг/сут. аспарагината цинка внутрижелудочно, данные различия не являлись достоверными по сравнению с контролем (рис. 2, F). В то же время дополнительная физическая нагрузка в течение 14 сут. приводила к 31% повышению уровня цинка в шерсти. Как и в случае с животными с низкой физической активностью, дополнительное введение цинксоодержащей добавки на фоне повышенной физической активности не приводило к сколько-нибудь значимым изменениям исследуемого параметра. При этом, результаты многофакторного дисперсионного анализа согласуются с результатами погруппового сравнения вели-

чин, указывая на достоверное влияние лишь физической нагрузки (рис. 2, f).

Полученные экспериментальные данные, равно как и результаты ранее проведенных работ [7], свидетельствуют о повышении уровня цинка в тканях организма в результате его экзогенного поступления. Наблюдаемое достоверное повышение уровня цинка в печени и сыворотке крови животных в ответ на введение цинка в течение 7 сут. согласуется с определением данных тканей как пулов цинка с высокой скоростью обмена [8]. Также установлено, что физическая нагрузка приводит к повышению содержания цинка в исследуемых органах и тканях лабораторных животных, что противоречит ранее опубликованным исследованиям [9, 10]. Возможным механизмом повышения уровня исследуемого микроэлемента во внутренних органах при этом может являться перераспределение цинка в сторону интерстиция [11].

Оценка биохимических маркеров мышечной деятельности у животных, находившихся в эксперименте в течение 7 сут., продемонстрировала отсутствие сколько-нибудь значимых изменений уровня лактата, креатинина и активности креатинкиназы в ответ на введение различных доз аспарагината цинка животным на фоне низкой и высокой физической активности (табл. 1). В соответствии с результатами погруппового сравнения, многофакторный дисперсионный анализ не выявил достоверного влияния отдельных факторов и их взаимодействия на исследуемые параметры. В то же время, стоит отметить, что влияние физической нагрузки на активность креатинкиназы сыворотки приближалось к достоверному.

Проведенные исследования продемонстрировали, что поступление в организм лабораторных животных дополнительных доз цинка в течение 14 сут. не приводит к статистически значимому изменению сыворо-

Таблица 1

Влияние внутрижелудочного введения цинка на фоне физической нагрузки в течение 7 суток на сывороточную концентрацию лактата, креатинина, а также активность креатинкиназы у лабораторных животных

Группа	Лактат, ммоль/л	Креатинин, мкмоль/л	Креатинкиназа, ЕД/л
Контроль	2,7 ± 0,6	46,2 ± 6,4	889,5 ± 172,0
Zn 5	3,8 ± 1,6	45,7 ± 6,8	1100,4 ± 491,0
Zn 15	3,3 ± 1,0	46,3 ± 1,2	1215,1 ± 451,1
ФН	3,1 ± 0,7	51,8 ± 11,4	978,4 ± 218,7
Zn5 + ФН	2,8 ± 0,6	47,4 ± 10,3	768,4 ± 151,9
Zn15 + ФН	2,4 ± 0,6	45,0 ± 10,3	877,9 ± 165,3
Достоверность влияния факторов (factorial ANOVA), p			
ФН	0,109	0,491	0,070
Цинк	0,390	0,608	0,595
Цинк*ФН	0,082	0,605	0,170

Примечание. <sup>1, 2, 3, 4, 5</sup> — достоверность различий относительно 1, 2, 3, 4, 5 групп при p < 0,05.

точной концентрации лактата. В то же время, интенсивная физическая нагрузка сопровождалась достоверным повышением концентрации молочной кислоты в сыворотке крови животных на 36%. При этом интрагастральное введение 5 и 15 мг/кг/сут. аспарагината цинка на фоне повышенной физической активности вызывало достоверное снижение сывороточного уровня лактата на 21 и 50% относительно контроля с физической нагрузкой соответственно. Согласно результатам многофакторного дисперсионного анализа достоверное влияние на концентрацию лактата в сыворотке крови оказывало взаимодействие между факторами (физическая нагрузка, введение цинка). В то же время, степень влияния введения цинка на данный параметр приближалась к достоверной.

Введение 5 и 15 мг/кг/сут. аспарагината цинка интактным животным приводило к достоверному снижению концентрации креатинина в сыворотке крови на 30%. При этом физическая нагрузка сопровождалась статистически значимым повышением креатининемии на 25% относительно контрольных значений. Введение аспарагината цинка в дозах 5 и 15 мг/кг/сут. в организм животных на фоне физической нагрузки приводило к снижению уровня креатинина в сыворотке на 16 и 24% относительно значений соответствующего контроля (4-я группа). Как введение цинка, так и физическая активность оказывали достоверное влияние на концентрацию креатинина в сыворотке крови лабораторных животных. Несмотря на это, факториальное взаимодействие не оказывало статистически значимого влияния на данный параметр.

Активность креатинкиназы в сыворотке крови животных, получающих различные дозы аспарагината цинка, не характеризовалась достоверным изменением относительно контроля. Несмотря на 19% повышение активности данного фермента у животных, подвержен-

ных физической нагрузке, данное изменение также не являлось статистически значимым. Внутривенное введение 5 мг/кг/сут. аспарагината цинка на фоне физической нагрузки приводило к достоверному снижению активности креатинкиназы в сыворотке крови на 39% относительно соответствующего контроля. В то же время, введение большей дозы цинксодержащей добавки не вызывало сколько-нибудь значимых изменений активности фермента. Многофакторный дисперсионный анализ продемонстрировал отсутствие достоверного влияния, как физической нагрузки, так и введения цинка на определяемый параметр. В то же время, статистическое взаимодействие между факторами оказывало близкий к достоверному эффект на активность креатинкиназы.

Наблюдаемые изменения уровня биохимических показателей мышечной деятельности являются характерными при физической нагрузке. Так, в частности, повышение уровня лактата в сыворотке является следствием активации анаэробного гликолиза вследствие снижения парциального давления кислорода при мышечной работе и целого ряда других стимулов [12]. Повышение активности креатинкиназы в сыворотке животных является следствием повреждения и лабильности мембран миоцитов в ходе интенсивной физической нагрузки [13]. Креатининемия также имеет мышечное происхождение [14]. При этом важными механизмами развития повреждения мембран миоцитов являются окислительный стресс [15] и локальное воспаление [16]. Наблюдаемое снижение концентрации лактата, креатинина, а также активности креатинкиназы в сыворотке крови животных, получающих аспарагинат цинка на фоне физической нагрузки, является следствием протективного влияния металла на мышечную ткань. В частности, было продемонстрировано, что соединения цинка обладают ан-

Таблица 2

Влияние внутрижелудочного введения цинка на фоне физической нагрузки в течение 14 сут. на сывороточную концентрацию лактата, креатинина, а также активность креатинкиназы у лабораторных животных

Группа	Лактат, ммоль/л	Креатинин, мкмоль/л	Креатинкиназа, ЕД/л
Контроль	2,8 ± 0,7	44,1 ± 5,4	865,7 ± 170,0
Zn 5	3,5 ± 1,3	33,8 ± 3,2 <sup>1</sup>	911,7 ± 300,2
Zn 15	3,4 ± 0,4	34,0 ± 3,5 <sup>1</sup>	1049,2 ± 346,1
ФН	3,8 ± 0,6 <sup>1</sup>	55,2 ± 10,8 <sup>1</sup>	1030,0 ± 228,1
Zn5 + ФН	3,0 ± 0,7	46,2 ± 13,7 <sup>2,3</sup>	626,2 ± 144,5 <sup>2,4</sup>
Zn15 + ФН	1,9 ± 0,4 <sup>1,2,3,4,5</sup>	42,1 ± 12,0 <sup>4</sup>	850,6 ± 157,3
Достоверность влияния факторов (factorial ANOVA), p			
ФН	0,201	0,002	0,190
Zn	0,058	0,009	0,128
ФН x Zn	0,001*	0,841	0,0634

Примечание. <sup>1, 2, 3, 4, 5</sup> — достоверность различий относительно 1, 2, 3, 4, 5 групп при p < 0,05.



тиоксидантной и противовоспалительной активностью [17]. Более того, было показано, что соединения цинка обладают антигипоксическим действием [18], что также может обуславливать наблюдаемый эффект.

Таким образом, результаты проведенного исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. Введение аспарагината цинка в организм животных приводит к повышению содержания металла в печени, почках, шерсти и сыворотке, но не скелетной и сердечной мышце. При этом уровень цинка в печени и сыворотке является наиболее лабильным среди всех изучаемых тканей;

2. Физическая нагрузка приводит к достоверному повышению уровня цинка в почке и сыворотке крови, а также печени, скелетной мускулатуре и шерсти животных в отсроченный период;

3. Введение цинка на фоне физической нагрузки сопровождается разнонаправленным изменением содержания металла в исследуемых тканях;

4. Физическая нагрузка вызывает увеличение сывороточной концентрации лактата, креатинина, а также активности креатинкиназы;

5. Введение аспарагината цинка на фоне физической нагрузки приводит к достоверному снижению уровня лактата, креатинина, а также активности креатинкиназы в сыворотке.

## References

1. Haymes E.M. Vitamin and mineral supplementation to athletes. *Int. J. Sport. Nutr.* 1991; 1(2): 146-69.
2. Vincent J.B., Neggers, Y. Roles of Chromium (III), Vanadium, and Zinc in Sports Nutrition. In: Debasis Bagchi, Sreejayan Nair, Chandan K. Sen, eds. *Nutrition and Enhanced Sports Performance: Muscle Building, Endurance, and Strength*. Elsevier Academic Press; 2013. 447 p.
3. Williams M.H. Dietary supplements and sports performance: minerals. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 2005; 2(1): 43-9.
4. Troegubova N.A., Rylova N.V. Features of macro- and microelement composition of the saliva of young athletes. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2015; 96(2): 238-41. (in Russian)
5. Giolo De Carvalho F., Rosa F.T., Marques Miguel Suen V., Freitas E.C., Padovan G.J., Marchini J.S. Evidence of

zinc deficiency in competitive swimmers. *Nutrition*. 2012; 28(11-12): 1127-31.

6. Rosa G., Dantas E.H., de Mello D.B. The response of serum leptin, cortisol and zinc concentrations to concurrent training. *Hormones (Athens)*. 2011; 10(3): 215-21.

7. Baek M., Chung H.E., Yu J., Lee J.A., Kim T.H., Oh J.M., Lee W.J., Paek S.M., Lee J.K., Jeong, J., Choy J.H., Choi S.J. Pharmacokinetics, tissue distribution, and excretion of zinc oxide nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine*. 2012; 7: 3081-97.

8. King J.C. Determinants of maternal zinc status during pregnancy. *The American journal of clinical nutrition*. 2000; 71(5): 1334s-43s.

9. Baltaci A.K., Uzun A., Kilic M., Mogulkoc R. Effects of acute swimming exercise on some elements in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 2009; 127(2): 148-53.

10. Sivrikaya A., Bicer M., Akil M., Baltaci A.K., Mogulkoc R. Effects of zinc supplementation on the element distribution in kidney tissue of diabetic rats subjected to acute swimming. *Biological trace element research*. 2012; 147(1-3): 195-9.

11. Volpe S.L., Lowe N.M., Woodhouse L.R., King J.C. Effect of maximal exercise on the short-term kinetics of zinc metabolism in sedentary men. *Br. J. Sports Med.* 2007; 41(3):156-61.

12. Gladden L.B. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *J. Physiol.* 2004; 558(1): 5-30.

13. Baird M.F., Graham S.M., Baker J.S., Bickertaff G.F. Creatine-kinase-and exercise-related muscle damage implications for muscle performance and recovery. *Journal of nutrition and metabolism*. 2012. Available at: file:///C:/Users/1/Downloads/960363.pdf14. Warburton D.E.R., Welsh R.C., Haykowsky M.J., Taylor D.A., Hume D.P. Biochemical changes as a result of prolonged strenuous exercise. *Br. J. Sports Med.* 2002; 36(4): 301-3.

14. Powers S.K., Jackson M.J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.* 2008; 88(4): 1243-76.

15. Proske U., Morgan D.L. Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. *J. Physiol.* 2001; 537(2): 333-45.

16. Prasad A.S. Zinc: An antioxidant and anti-inflammatory agent: Role of zinc in degenerative disorders of aging. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2014; 28(4): 364-71.

17. Uryupov O.Yu., Sumina E.N. The mechanism of antihypoxic action of zinc compounds. *Byul. eksp. biol. i med.* 1985; 5: 578-80. (in Russian)

Поступила 24.08.15

## Сведения об авторах:

Медведева Юлия Сергеевна (Medvedeva Yu.S.), мл. науч. сотр. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»;

Алчинова Ирина Борисовна (Alchinova I.B.), вед. науч. сотр. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»;

Бонитенко Евгений Юрьевич (Bonitenko E.Yu.), доктор мед. наук, проф. директор ФГБНУ «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»

Карганов Михаил Юрьевич (Karganov M.Yu.), доктор биол. наук, проф., зав. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», e-mail: mkarganov@mail.ru

Никоноров Александр Александрович (Nikonov A.A.), доктор мед. наук, проф., зав. каф. биологической химии ГБОУ ВПО ОрГМА Минздрава России, e-mail: nikonorov\_all@mail.ru

Байгозина Е.А., Долгих В.Т., Совалкин В.И.

## Полиморфизм генов семейства интерлейкина-1 как фактор патогенеза нозокомиальной пневмонии

ГБОУ ВПО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
644043, Омск, ул. Ленина, 12

Несмотря на обилие исследований, посвящённых нозокомиальной пневмонии, до настоящего времени отсутствуют её чёткие диагностические критерии, а прогнозирование исхода госпитальной пневмонии базируется на отдельных клинических, инструментальных, лабораторных и других параметрах, не связанных между собой как звенья единого патогенеза. Внешние факторы, способствующие развитию данной пневмонии и определяющие её прогноз, освещены достаточно полно, и проблема кроется в том, что отсутствует комплексный клинический и патофизиологический подход к оценке исхода нозокомиальной пневмонии с учетом её иммуногенетических особенностей. Одним из аспектов изучения нозокомиальной пневмонии является оценка показателей иммунной системы, в частности, — цитокинов, имеющих как диагностическое, так и прогностическое значение. Как известно, уровень иммунной реактивности организма закреплён генетически, следовательно, определяющее значение имеет полиморфизм генов, кодирующих экспрессию цитокинов как основных участников межклеточного взаимодействия. В представленной статье установлено, что одним из факторов иммунопатогенеза нозокомиальной пневмонии является полиморфизм генов  $IL-1\beta$  (-511) C→T и  $IL-1RN^*$ . Генетическим маркером риска её развития является носительство аллеля C гена  $IL-1\beta$  (-511) C→T. Тяжесть течения и клинические особенности данной пневмонии ассоциируются с наличием в генотипе пациентов аллеля T гена  $IL-1\beta$  (-511) C→T. Реализация патогенетического действия указанного полиморфизма осуществляется за счёт гиперпродукции цитокина ИЛ-1β. Подверженность нозокомиальной пневмонии ассоциирована с гаплотипами  $IL-1RN^*4-IL-1\beta$  (-511) C→T генов одноимённых цитокинов, обладающих полярными биологическими эффектами.

**Ключевые слова:** нозокомиальная пневмония, полиморфизм генов цитокинов, интерлейкин-1, рецепторный антагонист интерлейкина-1.

**Для цитирования:** Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015; 59(4): 66-72.

Baygozina E.A., Dolgih V.T., Sovalkin V.I.

## Polymorphism of genes of interleukin-1 family as factor of pathogenesis of nosokomialny pneumonia

State budget institution of higher education «Omsk state medical university» of Ministry of Health of the Russian Federation,  
644043, Omsk, Lenin St., 12

Despite the abundance of research devoted to nosocomial pneumonia, so far there are no clear diagnostic criteria for it and predict the outcome of nosocomial pneumonia is based on the individual clinical, instrumental, laboratory and other parameters that are not related to each other as links in a single pathogenesis. External factors contributing to the development of the pneumonia and determine its prognosis, adequately lit, and the problem lies in the fact that no comprehensive clinical and pathophysiological approach to assessing the outcome of nosocomial pneumonia considering its immunogenetic features. One aspect of learning is nosocomial pneumonia appraisal of immune system, in particular, — cytokines that have both diagnostic and prognostic value. As is known, the level of immune reactivity of the organism is fixed genetically, therefore, determines the importance polymorphisms of genes coding for the expression of cytokines as key participants in the intercellular interactions. In the present article we found that one of the factors immunopathogenesis of nosocomial pneumonia is a gene polymorphism  $IL-1\beta$  (-511) C→T and  $IL-1RN^*$ . Genetic markers of risk of its development is the carrier of the allele C of gene  $IL-1\beta$  (-511) C→T. The severity and clinical features of the pneumonia associated with the presence of the genotype of the patients T allele of the gene  $IL-1\beta$  (-511) C→T. Implementation of the pathogenetic action of this polymorphism is carried out due to overproduction of the cytokine  $IL-1\beta$ . Exposure to nosocomial pneumonia associated with haplotypes  $IL-1RN^*4-IL-1\beta$  (-511) C→T gene of the same name cytokines having polar biological effects.

**Keywords:** nosocomial pneumonia, gene polymorphism of cytokines interleukin-1 receptor antagonist interleukin.

**For citation:** Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya. 2015; 59(4): 66-72

**For correspondence:** Baygozina E.A., e-mail: pulmonology55@mail.ru

**Для корреспонденции:** Байгозина Евгения Александровна, доктор мед. наук, доцент каф. госпитальной терапии с курсом эндокринологии; e-mail: pulmonology55@mail.ru

## Методика

Нозокомиальная пневмония является одним из наиболее часто встречающихся в стационаре инфекционных заболеваний, атрибутивная летальность от которой достигает 50—76%. К настоящему времени имеются единичные сведения о роли полиморфизма генов цитокинов в иммунопатогенезе нозокомиальной пневмонии, однако эти данные чрезвычайно варьируют и зачастую противоречат друг другу. В статье показано, что одним из факторов иммунопатогенеза нозокомиальной пневмонии является полиморфизм генов интерлейкина-1 (IL-1 $\beta$  (-511) C→T) и рецепторного антагониста интерлейкина-1 (IL-1RN\*). В ходе исследования установлено, что генетическим маркером риска развития нозокомиальной пневмонии является носительство аллеля C гена IL-1 $\beta$  (-511) C→T. Тяжесть же течения и клинические особенности данной пневмонии ассоциируются с наличием в генотипе пациентов аллеля T гена IL-1 $\beta$  (-511) C→T. Реализация патогенетического действия указанного полиморфизма осуществляется за счёт гиперпродукции цитокина ИЛ-1 $\beta$ . Подверженность нозокомиальной пневмонии ассоциирована с гаплотипами IL-1RN\*4-IL-1 $\beta$  (-511) C→T генов одноимённых цитокинов, обладающих полярными биологическими эффектами. Содержание ИЛ-1РА в периферической крови было достоверно выше у больных с аллелем ИЛ-1RN\*1, несущим 4 tandemных повтора, независимо от тяжести течения госпитальной пневмонии. Определение полиморфизма генов ИЛ-1 $\beta$  (-511) C→T и ИЛ-1RN позволяет прогнозировать риск развития нозокомиальной пневмонии и тяжесть её течения у конкретного пациента, что создаёт возможность для индивидуальной коррекции реакций иммунитета.

Одним из аспектов патогенеза нозокомиальной пневмонии (НП) являются показатели иммунной системы, в частности, цитокинов, в реализации биологических эффектов которых ключевую роль играет генетический полиморфизм [1, 2]. В зависимости от индивидуального ансамбля носительства аллельных вариантов генов цитокинов характер воспалительного ответа может значительно различаться между индивидами с разными генотипами [3]. К настоящему времени имеются единичные сведения о роли полиморфизма генов семейства интерлейкина-1 (IL-1) в иммунопатогенезе НП, однако эти данные чрезвычайно варьируют и зачастую противоречат друг другу [4], в связи с чем крайне важно установить патогенетическую значимость полиморфизма генов IL-1 $\beta$  и его рецепторного антагониста в формировании, тяжести течения и исходе данной пневмонии, что составляло цель настоящего исследования.

В исследование было включено 75 пациентов с НП. Материалом для исследования служила периферическая кровь. Исследовали полиморфизм генов IL-1 $\beta$  — замена цитозина (C) на тимин (T) в позиции -511 и рецепторного антагониста интерлейкина-1 (IL-1RN) — варибельность 86-членных tandemных повторов (VNTR) в интроне 2. ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови методом перхлоратной экстракции с этанольным осаждением [5]. Варианты гена, несущие точечные замены нуклеотидов в промоторном регионе IL-1 $\beta$  (-511) C→T, определялись методом анализа полиморфизма длин рестриционных фрагментов продуктов полимеразной цепной реакции — амплификации специфических участков генома с использованием праймеров, синтезированных в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАМН (Новосибирск). Структура праймеров и программа амплификации приведены в табл. 1. Анализ полиморфных локусов генов IL-1 $\beta$  и IL-1RN осуществлялся с помощью метода полимеразной цепной реакции в стандартных условиях на амплификаторе «Терцик» («ДНК-Технология», Москва) согласно общепринятой методике исследования [5]. Амплификация проводилась в буфере, содержащем 10 мМ Трис-HCl (pH 8,9); 50 мМ KCl; 1,7 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,05% Tween 20 с добавлением 0,2 мМ-раствора dNTP; 0,5 мкМ раствора праймеров; 20 нг ДНК и 1,0 ед. акт. Taq-полимеразы. Реакционная смесь в объеме 20 мкл покрывалась 40 мкл минерального масла. Для генотипирования полиморфного локуса (-511) C→T IL-1 $\beta$  использовался метод полимеразной цепной реакции с дальнейшей рестрикцией ампликонов эндонуклеазой рестрикции Aha871. При гидролизе амплификационного фрагмента гена IL-1 $\beta$  эндонуклеазой рестрикции Aha871 выявлялись фрагменты размером 520 п.н., 80 п.н. и 440 п.н. Фрагмент 520 п.н. указывал на присутствие аллеля -511T IL-1 $\beta$ . При наличии аллеля C определялись два фрагмента размером 80 п.н. и 440 п.н. Анализ рестриционных смесей проводился с помощью электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле в 1xTBE буфере. Фрагменты ДНК идентифицировались в проходящем ультрафиолетовом свете после окрашивания бромистым этидием.

Исследование полиморфизма IL-1RN проводилось с помощью полимеразной цепной реакции с праймерами, фланкирующими полиморфный регион в пределах второго интрона, в котором находилось варибельное количество tandemных повторов — 86 п.н. На рисунке представлены варианты полиморфизма гена IL-1RN.

Структура олигонуклеотидных праймеров для генов IL-1 $\beta$  и IL-1RN

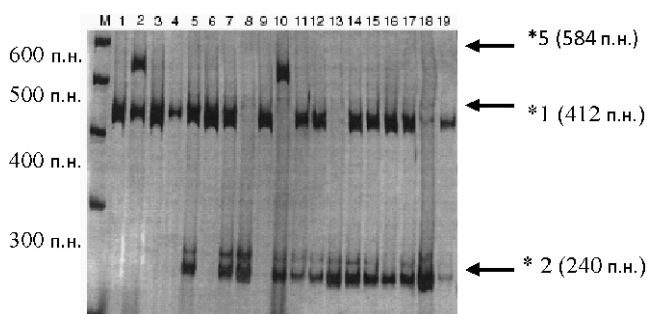
Ген	Мутация	Прямой праймер (F)	Обратный праймер (R)
IL-1 $\beta$	(-511) C $\rightarrow$ T	AAAGAGGCCAAAGGAGGGTGTTC	GGGTACAATGAAGGGCCAATAG
IL-1RN	Интрон 2 86 п.н. VNTR	CCCACTCATGGCCTTGTTC	GGTCAATGGGTACCACATC

Нормальный, наиболее часто встречающийся, вариант гена IL-1RN содержал четыре tandemных повтора; наиболее значимый из полиморфных вариантов аллель IL-1RN\*2 — два tandemных повтора; остальные варианты этого гена встречались крайне редко (менее чем у 1% популяции) и в данной работе не рассматривались.

Для краткого обозначения аллелей были приняты следующие сокращения: нормальный, не несущий мутацию аллель, обозначали цифрой 1; полиморфный — цифрой 2; ген, гомозиготный по нормальному варианту аллеля, — «1/1»; ген, гомозиготный по полиморфному варианту аллеля — «2/2»; гетерозиготный ген — «1/2» [1, 2]. Распределение генотипов по исследуемым полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди—Вайнберга с помощью точного теста Фишера. Обработка результатов генетических исследований осуществлялась с использованием критерия отношения шансов (ОШ) с расчётом для него 95% доверительного интервала. В качестве непараметрического метода статистики использовался U-критерий Манна—Уитни с применением пакета прикладных программ Statistica 6.0.

### Результаты и обсуждение

В исследовании распределение частот генотипов IL-1 $\beta$  (-511) C $\rightarrow$ T соответствовало равновесию Харди—Вайнберга ( $\chi^2 = 3,84$  для пациентов с НП и контрольной группой). Как следует из табл. 2, у пациентов с НП независимо от тяжести её течения



Большая П., 46 лет. Варианты полиморфизма гена IL-1RN по числу tandemных повторов в интроне 2: гомозиготы \*1/1 (полосы 1, 3, 4, 6, 9); гомозиготы \*2/2 (полосы 8, 13, 18); гетерозиготы \*1/2 (полосы 5, 7, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 19); гетерозиготы \*1/5 (полоса 2); гетерозиготы \*2/5 (полоса 10); М — маркер пар оснований.

генотип C/T встречался достоверно реже по сравнению с контрольной группой ( $p = 0,01$ ). По нашему мнению, патогенетическая значимость изученного полиморфного локуса -511C/T гена IL-1 $\beta$  заключалась в вариабельной продукции соответствующего цитокина, что являлось одним из определяющих факторов в клинической картине НП. В подтверждение этому установлено, что у пациентов с гомозиготным носительством аллеля С чаще наблюдалось тяжёлое течение госпитальной пневмонии по сравнению с контрольной группой (табл. 2). Пониженная секреция ИЛ-1 $\beta$  при носительстве генотипа С/С рассматривалась как фактор риска персистенции нозокомиальных патогенов, что приводило к затяжному разрешению пневмонии [3]. Поскольку белковые продукты генов IL-1 $\beta$  и IL-1RN являются естественными антагонистами, то рациональным представлялось проведение анализа сочетаний генотипов с риском развития госпитальной пневмонии. Для краткого обозначения аллелей гена IL-1RN были приняты следующие сокращения: нормальный (не несущий мутацию аллель, т.е. IL-1RN\*4) обозначали цифрой «1»; полиморфный, т.е. IL-1RN\*2, — цифрой «2»; ген, гомозиготный по нормальному варианту аллеля, — «1/1»; ген, гомозиготный по полиморфному варианту, — «2/2»; гетерозиготный ген — «1/2». Для варианта (-511) C $\rightarrow$ T при наличии аллеля С гаплогруппу обозначали «A1»; при отсутствии аллеля С — «A2» (табл. 3). Было выявлено, что среди больных с НП значительно чаще встречались индивиды с гаплогруппой \*2/\*2 — A2A2 (30,7% против 8,5% в контрольной группе;  $\chi^2 = 14,23$ ;  $p < 0,001$ ). Носители данной гаплогруппы имели достаточно высокий риск развития пневмонии (ОШ = 3,98; 95% ДИ 1,98—9,78). Гаплогруппы \*1/\*1-A1A2 и \*1/\*1-A2A2 также достоверно чаще встречались среди пациентов с госпитальной пневмонией ( $\chi^2 = 5,98$ ;  $p = 0,012$ ;  $\chi^2 = 5,18$ ;  $p = 0,02$ ), поэтому в той же мере рассматривались как маркеры повышенного риска развития НП (ОШ = 0,4; 95% ДИ 0,19—0,81 и ОШ = 0,21; 95% ДИ 0,05—0,78 соответственно). Функциональная значимость полиморфизма (-511) C $\rightarrow$ T обуславливалась гиперпродукцией провоспалительного цитокина ИЛ-1 $\beta$  у пациентов с НП с генотипом T/T. Содержание ИЛ-1 $\beta$  в сыворотке крови у больных-носителей генотипа T/T составило 294,5 пкг/мл, а у пациентов с генотипами C/C и C/T — 72,3 и 86,7 пкг/мл со-

ответственно ( $p < 0,01$ ). Аллель -511Т большинством исследователей признается «высокопродуктивным» [1], а больных с инфекционной патологией, гомозиготных по данному варианту аллеля, отличает острый характер протекания воспалительного ответа [2]. В нашем исследовании у больных с генотипом Т/Т и тяжёлым течением НП по сравнению с генотипами С/С и С/Т и среднетяжёлым течением заболевания отмечались клинические и лабораторные особенности, представленные в табл. 4.

Нами было выявлено, что реализация воспалительного ответа у лиц с различным генотипом гена IL-1 $\beta$  (-511) С→Т существенно различалась по интенсивности и продолжительности пневмонии, о чём свидетельствовали статистически значимые различия по длительности пребывания в отделении реанимации и интенсивной терапии между больными-носителями аллелей -511С и -511Т ( $p = 0,002$ ). У больных с аллелем Т гена IL-1 $\beta$  НП возникала более остро, агрессивно, сопровождалась гиперпиретическим типом лихорадки и осложнялась развитием сепсиса и синдромом полиорганной недостаточности. В подтверждение этому выявлялись достоверные различия между обследуемыми группами пациентов по шкалам APACHE II, MODS 2 и SOFA (табл. 4). Кроме того, у больных с данной пневмонией при наличии аллеля -511Т оказывалось более существенное вторичное иммунодефицитное состояние, о чём свидетельствовала выраженность лимфоцитопении (табл. 4). Уровень эндогенной интоксикации также был выше у больных, гомозиготных по аллелю Т ( $p = 0,004$ ). Тяжесть госпитальной пневмонии у больных с генотипом Т/Т гена IL-1 $\beta$  (-511) С→Т обуславливала пролонгирование респираторной поддержки, что, по-видимому, связывалось с объемом поражения лёгочной ткани и присоединением лёгочных осложнений. Длительность искусственной вентиляции лёгких в группе больных с аллелем -511Т превышала в 2 раза аналогичный показатель в группе больных с аллелем -511С ( $p < 0,0001$ ) (табл. 4). У пациентов с аллелем -511С отмечался затяжной характер НП, которая протекала субклинически, «маскируясь» фоном основного заболевания. Очевидно, что аллель -511С выявлялся у большинства здоровых людей и относился к немутантным вариантам, определяя адекватную продукцию соответствующих белков и регуляцию функционирования системы ИЛ-1 $\beta$ . Так называемый «мутантный» аллель -511Т выявлялся в группе больных с неблагоприятным исходом нозокомиальной пневмонии почти в 3,5 раза реже, следовательно, его присутствие в генотипе гена IL-1 $\beta$  (-511) С→Т не определяло исход заболевания. Его наличие приводило лишь к повышенной продукции ИЛ-1 $\beta$ , который в высоких концентрациях ассоциировался с патофизиологическими механизмами развития, течения и исхода госпитальной пневмонии. Нами рассматривались отдельные маркёры воспаления и показатели метаболизма у больных в критическом состоянии с НП в зависимости от аллельного полиморфизма гена IL-1 $\beta$  (-511) С→Т (табл. 5). Были получены достоверные различия между показателями газового состава крови у больных-носителей аллелей -511Т и -511С (парциальное напряжение кислорода в артериальной крови составляло  $7,9 \pm 0,62$  против  $10,3 \pm 0,23$  мм рт. ст. соответственно;  $p < 0,05$ ). Содержание CO $_2$  в артериальной крови у пациентов с аллелем -511Т оказывалось выше по сравнению с лицами-носителями аллеля -511С ( $44,8 \pm 1,9$  против  $37,4 \pm 0,8$  мм рт. ст. соответственно,  $p < 0,05$ ). Длительность искусственной вентиляции лёгких у больных-носителей аллеля -511Т с кахексией в 2 раза превышало аналогичный показатель в группе больных-носителей аллеля -511С ( $p < 0,05$ ), что свидетельствовало о декомпенсации дыхательной функции. Кроме этого, в группе пациентов-носителей аллеля -511Т гена IL-1 $\beta$  выявлялось достоверное увеличение противовоспалительного цитокина ИЛ-1РА по сравнению с группой больных-носителей аллеля -511С ( $1525,0$  пкг/мл против  $1209,0$  пкг/мл,  $p < 0,05$ ). По-видимому, избыточное количество ИЛ-1РА способствовало повышению чувствительности организма к различным инфекциям, включая возбудителей НП, что пролонгировало проведение искусственной вентиляции лёгких, приводило к истощению резервных возможностей организма и как итог, — к длительному пребыванию в отделении реанимации и интенсивной терапии. О наличии дисфункции различных органов, вплоть до развития синдрома полиорганной недостаточности, свидетельствовало снижение содержания альбумина в сыворотке крови у пациентов с аллелем -511Т (табл. 5). Интенсивность воспалительного процесса у больных с кахексией подтверждалась более высоким уровнем С-реактивного белка в периферической крови (табл. 5).

Адекватное течение воспалительного процесса в лёгких невозможно без баланса между активацией и ингибцией иммунной реактивности [6]. В связи с этим нами был изучен полиморфизм гена IL-1RN в качестве решающего фактора в продукции противовоспалительного цитокина рецепторного антагониста интерлейкина-1 (ИЛ-1РА). Наиболее значимым из мутантных вариантов данного гена является аллель IL-1RN\*2, несущий 2 повтора [6—8]. Нами не получено достоверных различий по аллельному полиморфизму гена IL-1RN между пациентами с тяжёлым, среднетяжёлым течением нозокомиальной пневмонии и контрольной группой.

Распределение частот генотипов IL-1 $\beta$  (-511) C→T у пациентов со среднетяжёлым и тяжёлым течением нозокомиальной пневмонии, абс. (доля)

Генотипы	Пациенты с тяжёлой НП (n = 43)	Пациенты со среднетяжёлой НП (n = 32)	Контрольная группа (n = 58)
C/C	20 (0,47) <sup>^</sup>	20 (0,63)	18 (0,31)
C/T	19 (0,44)*	11 (0,34) <sup>#</sup>	37 (0,64)
T/T	4 (0,09)	1 (0,03)	3 (0,05)

Примечание. \* — достоверность различий между группами больных с тяжёлой нозокомиальной пневмонией и контролем по генотипу C/T ( $\chi^2 = 8,72$ ;  $p = 0,01$ ) — по двустороннему критерию Фишера. <sup>^</sup> — достоверность различий между группами больных с тяжёлой нозокомиальной пневмонией и контролем по генотипу C/C; ( $\chi^2 = 8,65$ ;  $p = 0,003$ ) — по двустороннему критерию Фишера; <sup>#</sup> — достоверность различий между группами со среднетяжёлой нозокомиальной пневмонией и контролем по генотипу C/T; ( $\chi^2 = 7,41$ ;  $p = 0,005$ ) — по двустороннему критерию Фишера.

Анализ гаплогрупп — IL-1RN-IL-1 $\beta$  (-511) C→T у больных с нозокомиальной пневмонией и в контрольной группе

Гаплогруппа IL-1RN — IL-1 $\beta$ (-511) C→T	Пациенты с нозокомиальной пневмонией (n = 75); абс. (%)	Контрольная группа (n = 59); абс. (%)	p
*2/*2-A2A2	23 (30,7)	5 (8,5)	0,001
*1/*2-A1A2	34 (45,3)	21 (35,6)	0,24
*1/*2-A2A2	3 (4)	6 (10,2)	0,23
*1/*2-A1A1	3 (4)	2 (3,4)	1,0
*1/*1-A1A2	9 (12)	15 (25,5)	0,012
*1/*1-A2A2	2 (2,7)	6 (10,2)	0,02
*2/*2-A1A1	0	1 (1,7)	0,34
*2/*2-A1A2	1 (1,3)	1 (1,7)	1,0
*1/*1-A1A1	0	2 (3,4)	0,34

Клинические и лабораторные параметры больных с нозокомиальной пневмонией в зависимости от полиморфизма гена IL-1 $\beta$  (-511) C→T, (Me; LQ-UQ)

Критерий	Аллель C, (n = 110)	Аллель T, (n = 39)	p <sub>u</sub>
Возраст, лет	54,5 (25–72)	50 (28–72)	0,84
Койко-день в ОРИТ, сут.	4 (4–15)	16 (10–29)	0,002
Продолжительность госпитализации, сут.	30 (19–37)	33 (19–48)	0,18
Показатели по шкале APACHE, баллы	22 (17–28)	28 (22–33)	0,004
Показатели по шкале MODS, баллы	6 (3–8)	7 (4–9)	0,03
Показатели по шкале SOFA, баллы	7 (6–10)	10 (8–14)	0,01
Риск летального исхода, %	40,3 (22,5–60)	58,9 (40–75)	0,001
Показатели по шкале CPIS, баллы	8 (7–9)	9 (8–10)	0,001
Количество операций	1 (1–2,5)	2 (1–4)	0,008
Длительность ИВЛ, сут.	7,5 (2–10)	15 (8–22)	0,001
Лимфоциты, %	8,5 (5–13,5)	7 (4–11)	0,004
ЛИИ	7,6 (5,5–14,5)	10,1 (8–15,7)	0,04
АСАТ, Ед/л	36,5 (14–39,5)	51 (33–68)	0,01
АЛАТ, Ед/л	19,5 (15–38,2)	25 (16–53)	0,16

Примечание. Me — медиана; LQ — нижний квартиль; UQ — верхний квартиль; p<sub>u</sub> — достоверность различий между группами (критерий Манна—Уитни); ОРИТ — отделение реанимации и интенсивной терапии; APACHE — шкала оценки острых физиологических расстройств и хронических нарушений состояния; MODS — шкала оценки множественной органной функции; SOFA — шкала оценки последовательной органной недостаточности; CPIS — шкала оценки инфекционного процесса в лёгких; ИВЛ — искусственная вентиляция лёгких; ЛИИ — лейкоцитоксикационный индекс; АСАТ — аспарагиновая аминотрансфераза; АЛАТ — аланиновая аминотрансфераза.

Показатели метаболизма у пациентов с тяжёлой нозокомиальной пневмонией, находившихся в отделении реанимации и интенсивной терапии, в зависимости от аллельного полиморфизма гена IL-1 $\beta$  (-511) C→T

Характеристика	Аллель T, (n = 39)	Аллель C, (n = 110)
Оценка функции легких (M $\pm$ SD)		
PaO <sub>2</sub> , (кПа)	7,9 $\pm$ 0,62*	10,3 $\pm$ 0,23*
PaCO <sub>2</sub> , (кПа)	5,8 $\pm$ 0,85	5,3 $\pm$ 0,64
PaO <sub>2</sub> , мм рт. ст.	66,7 $\pm$ 9,8	69,8 $\pm$ 8,7
PaCO <sub>2</sub> , мм рт. ст.	44,8 $\pm$ 1,9*	37,4 $\pm$ 0,8*
Длительность ИВЛ, сут.	15 $\pm$ 1,3*	7,5 $\pm$ 0,8*
Медиаторы воспаления (Me; LQ-UQ)		
ФНО- $\alpha$ в сыворот., пкг/мл	8,3 (5,4–11,1)	7,9 (4,8–10,5)
ИЛ-1 $\beta$ в сыворот., пкг/мл	57,6 (30,7–98,0)	44,1 (29,8–91,8)
ИЛ-1РА в сывор., пкг/мл	1525 (774–2416)*	1210 (656–1896)*
СРБ в сыворотке, мг/л	12,2 (6,5–72,6)*	3,1 (0,4–65,7)*
Фибриноген в сыворот., г/л	5,2 (3,5–6,7)	4,7 (3,2–6,2)
Альбумин в сыворотке, г/л	41,4 $\pm$ 1,9*	48,1 $\pm$ 1,2*

Примечание. Me — медиана; LQ — нижний квартиль; UQ — верхний квартиль; \* — достоверность между обследуемыми группами ( $p < 0,05$ ) — критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферони; ФНО- $\alpha$  — фактор некроза опухоли альфа; СРБ — С-реактивный белок.

В подтверждение наших результатов в исследовании F. Amalich и соавт. также не выявлено достоверных различий по аллельному полиморфизму гена IL-1RN у больных с пневмонией и контрольной группой [9]. Несмотря на это, интерес к данному полиморфному локусу был связан с тем фактом, что индивидуумы-гомозиготы по аллелю IL-RN\*2 намного чаще подвергаются различным инфекционно-воспалительным заболеваниям, что связано со способностью ИЛ-1РА ингибировать действия ИЛ-1 на лимфоциты и фибробласты путем блокирования связывания данного цитокина с клеточными рецепторами, что делает воспалительный ответ более продолжительным [1]. В дополнении к этому P.P. Patwari и соавт. доказали, что с наличием аллеля IL-1RN\*2 ассоциируется тяжёлое течение внебольничной пневмонии [10]. Спорным остается вопрос о способности гена IL-1RN количественно влиять на продукцию одноименного цитокина [11, 12]. Согласно данным собственного исследования, содержание ИЛ-1РА в периферической крови у больных с аллелем IL-1RN\*1 было достоверно выше (1944 пкг/мл) по сравнению с группой пациентов, несущих в генотипе аллель IL-1RN\*2 (1296 пкг/мл) ( $p < 0,01$ ). Мы объясняли это двумя возможными причинами. Во-первых, в условиях НП и синдрома системного воспалительного ответа закономерно угнетение функции периферических мононуклеарных клеток к цитокинопродукции ИЛ-1РА независимо от полиморфизма его гена. Во-вторых, у больных с данной пневмонией выявлялось достоверное повышение ИЛ-1 $\beta$  в сыворотке крови при носительстве

аллеля IL-1RN\*2, что объясняло острую фазу течения воспалительного процесса. В этом случае гиперпродукция ИЛ-1РА в сыворотке крови оказывала негативное влияние на течение данного заболевания, вызвав состояние иммуносупрессии. Подобные данные получены S. Witkin и соавт. [13, 14]. По нашим данным, аллель IL-1RN\*2 в 2 раза чаще встречался у пациентов с благоприятным исходом НП по сравнению с группой умерших больных (29% против 13% соответственно;  $p < 0,05$ ). Поскольку ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-1РА — естественные антагонисты, определено содержание ИЛ-1 $\beta$  в подгруппах пациентов с НП, являющихся носителями аллелей IL-1RN\*1 и IL-1RN\*2. Было выявлено, что содержание ИЛ-1 $\beta$  в плазме крови в 3,3 раза превышало концентрацию последнего в подгруппе пациентов-носителей аллеля IL-1RN\*2, по сравнению с подгруппой лиц, несущих аллель IL-1RN\*1 (207,4 пкг/мл против 63,1 пкг/мл соответственно;  $p < 0,001$ ). Это позволило нам правильно интерпретировать более низкие концентрации ИЛ-1РА в сыворотке крови у больных с аллелем IL-1RN\*2: все пациенты находились в острой фазе воспаления, в связи с чем у них зафиксировалось повышение концентрации ИЛ-1 $\beta$  в сыворотке крови. Таким образом, «сработал» принцип обратной связи: носительство IL-1RN\*2 было ответственно за повышенный уровень циркулирующего ИЛ-1РА. В свою очередь, увеличенная активация экспрессии и продукции ИЛ-1 $\beta$  являлась следствием сверхвыработки ИЛ-1РА. Более того, избыточная продукция секреторного ИЛ-1 $\beta$  у пациентов с аллелем IL-1RN\*1 влияла на характер и ис-

ход НП, что связано с эндотоксин-индуцированной летальностью [4]. Нами отмечались достоверные различия между содержанием секреторного ИЛ-1РА в плазме крови у пациентов с вентилятор-ассоциированной пневмонией — 1004,2 пкг/мл против 1605,6 пкг/мл у больных без респираторной поддержки ( $p < 0,01$ ).

### Выводы

Таким образом, дисбаланс между цитокинами ИЛ-1РА и ИЛ-1 $\beta$ , связанный с преобладанием полярных генотипов, является фактором патогенеза нозокомиальной пневмонии. Генетическим маркером риска её развития является носительство аллеля С гена ИЛ-1 $\beta$  (-511) С→Т. Тяжесть течения и клинические особенности данной пневмонии ассоциируются с наличием в генотипе пациентов аллеля Т гена ИЛ-1 $\beta$  (-511) С→Т. Реализация патогенетического действия указанного полиморфизма осуществляется за счёт гиперпродукции цитокина ИЛ-1 $\beta$ . Подверженность нозокомиальной пневмонии ассоциирована с гаплотипами ИЛ-1RN\*4-ИЛ-1 $\beta$  (-511) С→Т генов одноимённых цитокинов, обладающих полярными биологическими эффектами.

Определение генетических маркеров ИЛ-1RN\* и ИЛ-1 $\beta$  (-511) С→Т необходимо для понимания патогенеза нозокомиальной пневмонии и индивидуального прогнозирования риска её развития и характера течения инфекционного процесса в лёгких. Полученные в ходе исследования результаты обеспечивают наиболее эффективные методы диагностики и прогнозирования исхода нозокомиальной пневмонии, направленные на снижение риска летальности пациентов терапевтического и хирургического профиля.

### References

1. Gromova A.Yu. Polymorphism of genes IL-1 family of man. *Tsitokiny i vospalenie*. 2005; 4 (2): 3-12. (in Russian)
2. Gromova A.Yu., Timchuk L.E., Yanov Yu.K. i dr. Association of gene polymorphism of interleukin-1, with an incidence of chronic purulent rhinosinusitis and dysregulated

inflammatory response. *Rossiyskaya otolaringologiya*. 2005; 15 (2): 2-12. (in Russian)

3. Chernova O.A., Baranova N.B., Akberova N.I. i dr. The distribution of allele and genotype frequencies of polymorphic loci IL-1B, IL-1RN and IL-10 in humans by the persistence of mycoplasmas (*Mycoplasma hominis*). *Tsitokiny i vospalenie*. 2008; 4(4) : 11-4 ( in Russian)

4. Waterer G.W., Wundek R.G. Science review: genetic variability in the systemic inflammatory response . *Critical Care*. 2003; 7 (4): 308-14.

5. Konenkov V.I. The structural basis and functional significance of allelic polymorphism of cytokine genes and their receptors person. *Meditinskaya Immunologiya*. 2003; 5 (1-2): 11-28. (in Russian)

6. Barton P.T. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism, vaginal interleukin-1 receptor antagonist concentrations, and vaginal *Ureaplasma urealyticum* colonization in pregnant women. *Infect. Immun*. 2003; 71: 271-4.

7. Bosco P. Association of IL-1RN\*2 allele and methionine synthase 2756AA genotype with dementia severity of sporadic Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2004; 75 (7): 1036-8.

8. Glas J., Torok H.P., Schneider A. et al. Allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene is associated with early gastric cancer. *J. Clin. Oncol*. 2004; 22 (23) : 4694-700.

9. Arnalich F. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and mortality in patients with severe sepsis. *Clin. Exp. Immunol*. 2002; 127: 331-6.

10. Patwari P.P., O'Cain P., Goodman D.M. et al. Interleukin-1 receptor antagonist intron 2 variable number of tandem repeats polymorphism and respiratory failure in children with community-acquired pneumonia. *Pediatric Critical Care Medicine*. 2008; 9 (6): 553-9.

11. Rafiq S., Stevens K., Hurst A.J. et al. Common genetic variation in the gene encoding interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA) is associated with altered circulating IL-1RA levels. *Genes and Immunity*. 2007; 8: 344-51.

12. Walley A.J., Aucan C., Kwiatkowski D., Hill A.V.S. Interleukin-1 gene cluster polymorphisms and susceptibility to clinical malaria in a Gambian case-control study. *European Journal of Human Genetics*. 2004; 12: 132-8.

13. Witkin S., Linhares L.M., Gerber S. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and circulating levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA in Brazilian women. *Journal of Virology*. 2001; 75 (13): 6242-4.

14. Witkin S., Gerber S., Ledger W.J. Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease. *Clin. Infect. Dis*. 2002; 34 (2): 204-9.

Поступила 28.10.13

### Сведения об авторах:

Долгих Владимир Терентьевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии с курсом клинической патофизиологии

Совалкин Валерий Иванович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. госпитальной терапии с курсом эндокринологии



Горячева А.В.<sup>1</sup>, Терехина О.Л.<sup>1</sup>, Абрамочкин Д.В.<sup>2</sup>, Буданова О.П.<sup>1</sup>,  
Белкина Л.М.<sup>1</sup>, Смирин Б.В.<sup>1</sup>, Дауни Г.Ф.<sup>4</sup>, Малышев И.Ю.<sup>1,3</sup>, Манухина Е.Б.<sup>1,4</sup>

## Влияние адаптации к гипоксии на экспрессию изоформ NO-синтазы в миокарде

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

<sup>2</sup> — ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, 119991, Ленинские горы, д. 1

<sup>3</sup> — «Московский государственный медико-стоматологический университет», Москва, 127473, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

<sup>4</sup> — «Центр медицинских наук Университета Северного Техаса», г. Форт-Уэрт, 76107, США

Ранее мы показали, что адаптация к периодической нормобарической гипоксии (АГ) обладает кардио- и вазопротекторным эффектом и предупреждает сопутствующий нитрозативный стресс. Цель настоящей работы состояла в дальнейшем выяснении NO-зависимых механизмов АГ путем определения изоформы NO-синтазы (NOS), которая может играть главную роль в защитном эффекте АГ. АГ проводили путем вдыхания гипоксической газовой смеси (9,5–10% O<sub>2</sub>) в течение 5–10 мин, и атмосферного воздуха в течение 4 мин (5–8 циклов в сут., 21 сут). Экспрессию белка NOS определяли в миокарде левого желудочка с помощью Вестерн-блот анализа с соответствующими антителами. АГ приводила к уменьшению экспрессии iNOS на 71% ( $p < 0,05$ ), а eNOS на 41% по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). Содержание в миокарде nNOS после АГ не изменилось. Избирательное ингибирование iNOS воспроизводило вазопротекторный эффект адаптации. Полученные данные позволяют предположить, что АГ предупреждает повреждение миокарда и сосудов при ИР за счет ограничения экспрессии белка iNOS и, возможно, eNOS.

**Ключевые слова:** адаптация к гипоксии, NO-синтаза, ишемическое и реперфузионное повреждение миокарда, коронарные сосуды, дисфункция эндотелия, вазопротекция.

**Для цитирования:** Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015; 59(4): 73-77

Goryacheva A.V.<sup>1</sup>, Terekhina O.L.<sup>1</sup>, Abramochkin D.V.<sup>2</sup>, Budanova O.P.<sup>1</sup>,  
Belkina L.M.<sup>1</sup>, Smirin B.V.<sup>1</sup>, Downey H.F.<sup>4</sup>, Malyshev I.Yu.<sup>3</sup>, Manukhina E.B.<sup>1,4</sup>

## Effect of adaptation to hypoxia on expression of NO synthase isoforms in rat myocardium

<sup>1</sup> — Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow

<sup>2</sup> — M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

<sup>3</sup> — Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow

<sup>4</sup> — University of North Texas Health Science Center, Fort Worth, USA

Previously we have shown that adaptation to hypoxia (AH) is cardio- and vasoprotective in myocardial ischemic and reperfusion injury and this protection is associated with restriction of nitrosative stress. The present study was focused on further elucidation of NO-dependent mechanisms of AH by identifying specific NO synthases (NOS) that could play the major role in AH protection. AH was performed in a normobaric hypoxic chamber by breathing hypoxic gas mixture (9.5–10% O<sub>2</sub>) for 5–10 min with intervening 4 min normoxia (5–8 cycles daily for 21 days). Expression of neuronal (nNOS), inducible (iNOS), and endothelial (eNOS) protein was measured in the left ventricular myocardium using Western blot analysis with respective antibodies. AH reduced iNOS protein expression by 71% ( $p < 0,05$ ) whereas eNOS protein expression tended to be reduced by 41% compared to control ( $p < 0,05$ ). nNOS protein expression remained unchanged after AH. Selective iNOS inhibition can mimic the AH-induced protection. Therefore protective effects of AH could be at least partially due to restriction of iNOS and, probably, eNOS expression.

**Key words:** adaptation to hypoxia, NO synthase, myocardial ischemic and reperfusion injury, coronary vessels, endothelial dysfunction, vasoprotection.

**For citation:** Patologicheskaya Fiziologiya I eksperimentalnaya terapiya. 2015; 59(4): 73-77

**For correspondence:** Manukhina E.B., e-mail: manukh@mail.ru

**Для корреспонденции:** Манухина Евгения Борисовна, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр. лаб. регуляторных механизмов стресса и адаптации, ФГБНУ НИИОПП, Москва и адъюнкт-профессор Отдела интегративной физиологии Центра медицинских наук Университета Северного Техаса, Форт-Уэрт, США, e-mail: manukh@mail.ru

Известно, что адаптация к периодической гипоксии (АГ) обладает кардио- и вазопротекторным эффектом. Так, в многочисленных экспериментальных исследованиях было показано, что при ишемическом и реперфузионном (ИР) повреждении сердца АГ оказывает антиаритмическое действие, ограничивает размер инфаркта и предупреждает дисфункцию миокарда [1—3]. В клинических исследованиях АГ снижала частоту ишемических и неишемических аритмий и стенокардических приступов [4] и значительно увеличивала толерантность к физическим нагрузкам у кардиологических пациентов [6]. Вазопротекторный эффект АГ изучен меньше. Этот защитный эффект, который проявляется, в частности, в предупреждении дисфункции эндотелия, был продемонстрирован для аорты крыс со спонтанной гипертензией [7], сосудов мозга у крыс с экспериментальной болезнью Альцгеймера [8], коронарных и некоронарных сосудов при ишемическом и реперфузионном повреждении миокарда [9].

В настоящее время NO-зависимые механизмы вазопротекторного эффекта АГ при ИР миокарда практически не изучены. В предыдущем исследовании [10] мы показали, что предупреждение ИР повреждений миокарда и дисфункции эндотелия коронарных сосудов с помощью АГ сопровождается ограничением гиперпродукции NO в миокарде и нитрозативного стресса. В указанной работе АГ уменьшала образование токсичного продукта NO пероксинитрита как в миокарде, так и в стенке сосудов. Однако вопрос о вкладе конкретных изоформ NO-синтазы в формирование АГ остается открытым.

В настоящей работе был использован режим АГ, который успешно применяется в кардиологической клинике [5, 6] и использовался в наших предыдущих экспериментах [1, 7, 9, 10]. Цели исследования состояли в 1) определении изоформы NOS, которая потенциально может быть вовлечена в защитные эффекты АГ, и 2) доказательстве участия этой изоформы в вазопротекторном эффекте АГ путем оценки возможности воспроизведения вазопротекторного эффекта АГ с помощью избирательного ингибирования этой изоформы.

### Методика

Эксперименты проводились на крысах-самцах линии Вистар массой 250—280 г.

АГ создавали в гипоксической камере циклами. Каждый цикл состоял во вдыхании гипоксической газовой смеси (9,5—10% O<sub>2</sub>) в течение 5—10 мин, чередующимся с дыханием атмосферным воздухом в течение 4 мин. Каждый сеанс АГ состоял из 5—8 циклов ежедневно. Полный курс АГ длился

21 сут. Контрольные животные находились в тех же условиях, при которых проводилась адаптация к гипоксии, в течение 21 сут., но вместо гипоксической газовой смеси крысы дышали атмосферным воздухом.

Оценка эндотелийзависимой функции коронарных сосудов проводилась на изолированном сердце, перфузируемом по Лангендорфу при постоянном давлении 100 мм рт. ст. и стимуляции с частотой 5 Гц (300 уд./мин.) при длительности импульса 2 мс и амплитуде импульса 5—7 В. Скорость коронарного протока оценивали путем непрерывной регистрации массы вытекающего из сердца перфузата. Полученные значения скорости протока выражали в мл/мин и нормировали на амплитуду волны давления по формуле  $V = (v \times 100 \text{ мм рт. ст.})/\rho$ , где  $v$  — ненормированная скорость протока, зарегистрированная в эксперименте,  $\rho$  — амплитуда волны давления в мм рт. ст. (средняя за мин), а 100 мм рт. ст. — постоянный уровень перфузионного давления.

Повреждение ИР создавали *in vitro* путем полного прекращения протока на 15 мин с последующей реперфузией в течение 10 мин. Величину эндотелийзависимой дилатации коронарных сосудов оценивали по увеличению скорости протока в ответ на введение ацетилхолина (АХ, 10<sup>-7</sup> М) в течение 6 мин с помощью инфузора LSP04-1A (Longerpump, Китай). Этот метод был подробно описан ранее [9].

Экспрессию белка изоформ NOS — нейрональной (nNOS), индуцибельной (iNOS) и эндотелиальной (eNOS) — определяли в миокарде левого желудочка с помощью Вестерн-блот-анализа с использованием поликлональных антител к nNOS, iNOS и eNOS (Assay Designs, США), стандартов соответствующих изоформ NOS в качестве положительного контроля и вторых антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (Assay Designs, США). Количественную обработку полученных иммуноблотов проводили путем сканирования и анализа оптической плотности блотов с помощью компьютерной программы Photoshop. Результаты представляли в виде репрезентативных диаграмм, как отношение площади сигнала в пикселях к интенсивности сигнала.

Исходя из полученных результатов по экспрессии изоформ NOS, было изучено влияние селективного ингибитора iNOS амингуанидина (АМГ) на вызванную ИР дисфункцию эндотелия коронарных сосудов. АМГ вводили в дозе 50 мг/кг, в/б в течение 2 сут. до эксперимента.

Статистическая обработка проводилась с помощью t-критерия Стьюдента и U-критерия Вилкоксона—Манна—Уитни. Данные усреднялись по группам и приводились как среднее ± SEM. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

На рис. 1 показано, что АГ приводила к уменьшению экспрессии iNOS в миокарде левого желудочка на 71% ( $p < 0,05$ ), а eNOS — на 41% по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). Содержание в миокарде pNOS после АГ не изменилось. Полученные данные позволяют предположить, что АГ предупреждает повреждение миокарда и сосудов при ИР за счет ограничения экспрессии белка iNOS и eNOS.

Как и в наших предыдущих исследованиях [9], ИР вызывала значительную дисфункцию эндотелия коронарных сосудов (рис. 2), которая проявлялась в уменьшении дилятаторной реакции на АХ: в сердце неадаптированных крыс после ИР повреждения сохранялось лишь  $12,3 \pm 1,8\%$  реакции на АХ по сравнению с ответом на АХ до ИР. Сама по себе АГ не вызывала достоверных изменений эндотелийзависимого расширения коронарных сосудов, но полностью предупреждала дисфункцию эндотелия при ИР миокарда. Введение АМГ достоверного влияния на функцию коронарного эндотелия не оказывало. При этом АМГ, как и АГ, предупреждал дисфункцию эндотелия коронарных сосудов, и угнетение эндотелийзависимого расширения коронарных артерий после введения АМГ, как и после АГ, было недостоверным. Полученный результат подтверждает предположение об участии iNOS в ИР повреждении, а также о том, что одним из вазопротекторных механизмов АГ является ограничение экспрессии iNOS при ИР. Однако следует отметить, что эндотелийзависимое расширение на фоне АМГ составило 50% от контроля ( $p > 0,05$ ), тогда как АГ устранила дисфункцию эндотелия на 100%. По-видимому, вазопротекторный эффект АГ не сводится только к ограничению экспрессии iNOS. Можно предположить, что отмеченное нами ограничение экспрессии eNOS также вносит вклад в предупреждение дисфункции коронарного эндотелия.

Кардиопротекторные эффекты АГ хорошо известны, хотя их механизмы, в особенности, NO-зависимые, изучены недостаточно, а существующие данные противоречивы [4, 11]. NO может оказывать благоприятное действие при ИР повреждении, вызывая дилатацию коронарных сосудов, но в то же время, избыток NO, образующийся во время реперфузии, высокотоксичен [12]. Поэтому способность АГ одновременно стимулировать синтез NO в процессе чередования периодов гипоксии и нормоксии и предупреждать гиперпродукцию NO при ИР миокарда [11], очевидно, играет важную роль в ее защитных эффектах.

В настоящей работе мы показали, что вазопротекторный эффект АГ сопровождается ограничением экспрессии iNOS и eNOS при ИР миокарда. Вазопротекторное действие избирательного ингибитора iNOS

АМГ, аналогичное действию АГ, указывает на роль ограничения экспрессии iNOS, и, вероятно, eNOS, в вазопротекторном эффекте АГ. Ранее важную роль iNOS в ИР повреждении миокарда отмечали D. Wang и соавт. [13], которые наблюдали интенсивную экспрессию белка iNOS и mPDK после ишемии. Избирательное ингибирование iNOS уменьшало размер инфаркта, причем пропорционально степени ингибирования. Недавно было показано, что АМГ воспроизводит кардиопротекторное действие ишемического посткондиционирования [14].

В литературе имеются данные, которые кажутся противоречащими результатам нашего исследования. Например, в ряде работ периодическая гипоксия вызывала дисфункцию сосудистого эндотелия [15, 16]. H. Ding и соавт. [17] показали, что АГ не ограничивает, а, напротив, стимулирует экспрессию iNOS

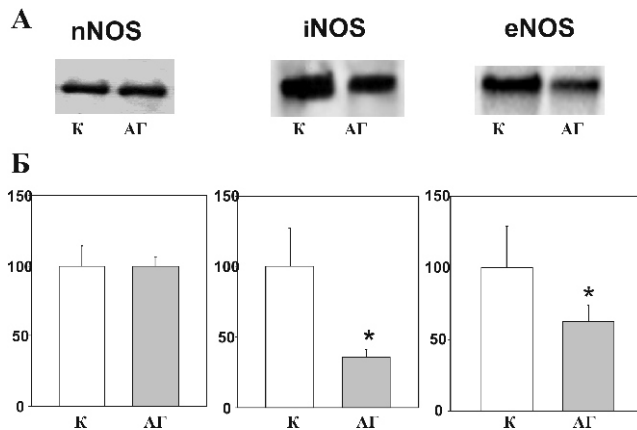


Рис. 1. Влияние АГ на экспрессию белка изоформ NO-синтазы в миокарде левого желудочка крысы. А — репрезентативные иммуноблоты NO-синтаз. Б — диаграммы, отражающие полуколичественный анализ иммуноблотов. К — контроль, АГ — адаптация к гипоксии. \*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

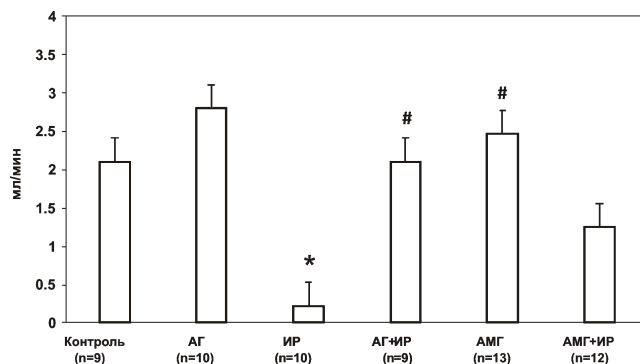


Рис. 2. Влияние АГ и АМГ на нарушение эндотелийзависимой дилатации коронарных сосудов при ИР миокарда. Диаграммы показывают величину прироста коронарного протока в ответ на ацетилхолин в мл/мин; \*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; #  $p < 0,05$  по сравнению с ИР.

в миокарде и предположили, что iNOS вносит вклад в кардиопротекторное действие АГ. Согласно данным J. Baker и соавт. [18], АГ стимулирует экспрессию eNOS и не влияет на экспрессию iNOS. Предположение о кардиопротекторной роли гипоксического стимулирования экспрессии iNOS также было выдвинуто L. Xi и соавт. [19].

Одной из причин таких противоречий является то, что протоколы, используемые при изучении периодической гипоксии, значительно варьируют по длительности, частоте и интенсивности гипоксических воздействий. Важно отметить, что указанные выше работы были выполнены в условиях адаптации к гипобарической гипоксии при высоком разрежении воздуха, соответствующем высоте 5000 м над уровнем моря [17], адаптации к непрерывной, хронической гипоксии [18], при тяжелой периодической гипоксии (5% O<sub>2</sub>), соответствующей гипоксии при апноэ сна [15, 16], или при гипоксическом прекондиционировании [19]. Между тем, именно режим гипоксического воздействия определяет, что будет ответной реакцией — повышение резистентности организма или развитие патологии [20], и при разных режимах воздействия гипоксия может оказывать прямо противоположное действие на многие регуляторные системы, включая синтез NO и экспрессию NOS [21, 22]. Поэтому целесообразно сопоставлять результаты, полученные с использованием аналогичных схем АГ.

Так, у собак, адаптированных к гипоксии в том же режиме, который использовался в нашем исследовании и применяется в клинике [5, 6], было показано, что АГ снижает суммарную активность NOS и одновременно ограничивает экспрессию eNOS в левом желудочке [23]. При этом кровоток в левой коронарной артерии в покое и степень реактивной гиперемии при реперфузии оставались без изменений после АГ. Следовательно, снижение продукции NO при реперфузии у адаптированных животных не связано с уменьшением напряжения сдвига, которое является ключевым стимулятором активности eNOS [24].

Можно предположить, что в ходе АГ периодическое чередование эпизодов гипоксии и нормоксии может вызывать образование NO в миокарде в умеренном, нетоксичном количестве [25]. Образовавшийся NO за счет механизма отрицательной обратной связи может подавлять экспрессию и активность NOS [26, 27], что обеспечивает защиту миокарда и коронарных сосудов от гиперпродукции NO во время реперфузии.

Патофизиологическая связь между дисфункцией эндотелия коронарных сосудов и ИР повреждением миокарда является двусторонней. С одной стороны, дисфункция эндотелия вносит значительный вклад в прогрессирование атеросклероза коронарных сосудов. С другой стороны, эндотелий очень чувствителен

к ИР повреждению; 15—20-минутная ишемия уже вызывает повреждение эндотелиальных клеток, тогда как функция гладкомышечных клеток коронарных сосудов остается неизменной [28]. Такая уязвимость эндотелия в большой степени определяет степень повреждения миокарда и, следовательно, величину инфаркта [29]. Поэтому защита эндотелия имеет большое значение для клиники. Данные, полученные в настоящем исследовании, свидетельствуют о возможности использования для такой защиты, как нефармакологических методов, так и препаратов, воспроизводящих их вазопротекторное действие.

## References

1. Belkina L.M., Smirnova E.A., Shimkovich M.V., Terekhina O.L., Goryacheva A.V., Chepurnova D.A. et al. Cardioprotective effect of adaptation to intermittent normobaric hypoxia in rats. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2012; 4: 44-8. (in Russian)
2. Sanchis-Gomar F., Vina J., Lippi G. Intermittent hypobaric hypoxia applicability in myocardial infarction prevention and recovery. *J. Cell. Mol. Med.* 2012; 16(5): 1150-4.
3. Zong P., Setty S., Sun W., Martinez R., Tune J.D., Ehrenburg I.V. et al. Intermittent hypoxic training protects canine myocardium from infarction. *Exp. Biol. Med.* 2004; 229: 806-12.
4. Anderson J., Honigman B. The effect of altitude-induced hypoxia on heart disease: Do acute, intermittent and chronic exposures provide cardioprotection? *High Alt. Hyp. Med.* 2011; 12: 45-55.
5. Lyamina N.P., Lyamina S.V., Senchiknin V.N., Mallet R.T., Downey H.F., Manukhina E.B. Normobaric hypoxia conditioning reduces blood pressure and normalizes nitric oxide synthesis in patients with arterial hypertension. *J. Hypertens.* 2011; 29: 2265-72.
6. Burtscher M., Pachinger O., Ehrenbourg I., Mitterbauer G., Faulhaber M., Puhlinger R., Tkatchouk E. Intermittent hypoxia increases exercise tolerance in elderly men with and without coronary artery disease. *Int. J. Cardiol.* 2004; 96: 247-54.
7. Manukhina E.B., Jasti D., Vanin A.F., Downey H.F. Intermittent hypoxia conditioning prevents endothelial dysfunction and improves nitric oxide storage in spontaneously hypertensive rats. *Exp. Biol. Med.* 2011; 236: 867-73.
8. Mashina S.Yu., Aleksandrini V.V., Goryacheva A.V., Vlasova M.A., Vanin A.F., Malyshev I.Yu., Manukhina E.B. Adaptation to hypoxia prevents disorders of cerebral circulation in neurodegenerative damage: Role of nitric oxide. *Bulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny*. 2006; 142 (8): 132-5. (in Russian)
9. Manukhina E.B., Terekhina O.L., Belkina L.M., Abramochkin D.V., Budanova O.P., Mashina S.Yu. et al. Vasoprotective effect of adaptation to hypoxia in ischemic and reperfusion heart injury. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2013; 4: 26-31. (in Russian)
10. Goryacheva A.V., Belkina L.M., Terekhina O.L., Downey H.F., Mallet R.T., Smirin B.V. et al. Role of prevention of nitric oxide overproduction in the cardioprotective effect of adaptation to intermittent hypoxia. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2012; 1: 23-8. (in Russian)
11. Manukhina E.B., Downey H.F., Mallet R.T. Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia. *Exp. Biol. Med.* 2006; 231: 343-65.

12. Jones S.P., Bolli R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2006; 40: 16-23.
13. Wang D., Yang X.P., Liu Y.H., Carretero O.A., LaPointe M.C. Reduction of myocardial infarct size by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Am. J. Hypertens.* 1999; 12: 174-82.
14. Zaman J., Jeddi S., Daneshpour M.S., Zarkesh M., Daneshian Z., Ghasemi A. Ischemic postconditioning provides cardioprotective and antiapoptotic effects against ischemia-reperfusion injury through iNOS inhibition in hyperthyroid rats. *Gene.* 2015; Jun 6. pii: S0378-1119(15)00719-2. doi: 10.1016/j.gene.2015.06.011. [Epub ahead of print]
15. Krause B.J., Del Rio R., Moya E.A., Marquez-Gutierrez M., Casanello P., Iturriaga R. Arginase-endothelial nitric oxide synthase imbalance contributes to endothelial dysfunction during chronic intermittent hypoxia. *J. Hypertens.* 2015; 33: 515-24.
16. Marcus N.J., Philippi N.R., Bird C.E., Li Y.L., Schultz H.D., Morgan B.J. Effect of AT1 receptor blockade on intermittent hypoxia-induced endothelial dysfunction. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2012; 183: 67-74.
17. Ding H.L., Zhu H.F., Dong J.W., Zhu W.Z., Yang W.W., Yang H.T., Zhou Z.N. Inducible nitric oxide synthase contributes to intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury. *Acta Pharmacol. Sin.* 2005; 26: 315-22.
18. Baker J.E., Holman P., Kalyanaraman B., Griffith O.W., Pritchard K.A. Jr. Adaptation to chronic hypoxia confers tolerance to subsequent myocardial ischemia by increased nitric oxide production. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1999; 874: 236-53.
19. Xi L., Tekin D., Gursoy E., Salloum F., Levasseur J.E., Kukreja R.C. Evidence that NOS2 acts as a trigger and mediator of late preconditioning induced by acute systemic hypoxia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002; 283: H5-H12.
20. Lavie L. Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia — revisited — the bad ugly and good: implications to the heart and brain. *Sleep Med. Rev.* 2015; 20: 27-45.
21. Fago A., Jensen F.B., Tota B., Feelisch M., Olson K.R., Helbo S. et al. Integrating nitric oxide, nitrite and hydrogen sulfide signaling in the physiological adaptations to hypoxia: A comparative approach. *Comp. Biochem. Physiol.* 2012; 162: 1-6.
22. Navarrete-Opazo A., Mitchell G.S. Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2014; 307: R1181-R1197.
23. Mallet R.T., Ryou M.-G., Manukhina E.B., Downey H.F. Beta-adrenergic signaling and ROS: Pivotal roles in intermittent, normobaric hypoxia-Induced cardioprotection. In: Xi L., Serebrovskaya T.V., eds. *Intermittent Hypoxia: From Molecular Mechanisms To Clinical Applications*. Hauppauge, Nova Science Publishers, 2009; 189-212.
24. Ryou M.-G., Sun J., Oguayo K.N., Manukhina E.B., Downey H.F., Mallet R.T. Hypoxic conditioning suppresses nitric oxide production upon myocardial reperfusion. *Exp. Biol. Med.* 2008; 233: 766-74.
25. Umbrello M., Dyson A., Feelisch M., Singer M. The key role of nitric oxide in hypoxia: hypoxic vasodilation and energy supply-demand matching. *Antioxid. Redox Signal.* 2013; 19: 1690-710.
26. Chang K., Lee S.J., Cheong I., Billiar T.R., Chung H.T., Han J.A. et al. Nitric oxide suppresses inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting post-translational modification of I-kappa-B. *Exp. Mol. Med.* 2004; 36: 311-24.
27. Kopicova J., Puzserova A., Bernatova I. Biochemical aspects of nitric oxide synthase feedback regulation by nitric oxide. *Interdiscip. Toxicol.* 2011; 4: 63-8.
28. Gori T., Di Stolfo G., Sicuro S. Nitroglycerin protects the endothelium from ischaemia and reperfusion: human mechanistic insight. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2007; 64: 145-50.
29. Jabs A., Fasola F., Muxel S., Munzel T., Gori T. Ischemic and non-ischemic preconditioning: Endothelium-focused translation into clinical practice. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2010; 45: 185-91.

Поступила 05.09.15

### Сведения об авторах:

Горячева А.В. (Goryacheva A.V.), науч. сотр. лаб. регуляторных механизмов стресса и адаптации, ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва

Терехина О.Л. (Terekhina O.L.), науч. сотр. лаб. биоэнергетики и проблем гипоксии, ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии

Абрамочкин Д.В. (Abramochkin D.V.), канд. биол. наук, мл. науч. сотр. каф. физиологии человека и животных, биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Ленинские горы, д. 1, корп. 12

Буданова О.П. (Budanova O.P.), науч. сотр. лаб. стресса и адаптации, ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии

Белкина Л.М. (Belkina L.M.), доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр. лаб. биоэнергетики и проблем гипоксии, ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии

Смирин Б.В. (Smirin B.V.), канд. биол. наук, с.н.с. лаб. регуляторных механизмов стресса и адаптации, ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии

Дауни Г.Ф. (Downey H.F.), регент-профессор Отдела интегративной физиологии Центра медицинских наук Университета Северного Техаса, г.Форт-Уэрт, США

Малышев И.Ю. (Malyshev I.Yu.), доктор мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии Московского государственного медико-стоматологического университета и зав. лаб. регуляторных механизмов стресса и адаптации ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва

Иванов Ю.Д.<sup>1</sup>, Мальсагова К.А.<sup>1</sup>, Татур В.Ю.<sup>2</sup>, Веснин С.Г.<sup>3</sup>, Иванова Н.Д.<sup>4</sup>, Зиборов В.С.<sup>5</sup>

## СВЧ-излучение воды в аналитических системах

<sup>1</sup> — ФГБНУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, 119121, Москва, Погодинская ул., д. 10

<sup>2</sup> — Фонд перспективных технологий и новаций, 115682, Москва, Шипиловская ул., д. 64, 1, 147

<sup>3</sup> — ООО «Фирма РЭС», Москва, 105082, Москва, Большая Почтовая ул., д. 22

<sup>4</sup> — ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина», 109472, Москва, ул. Академика Скрябина, д. 23

<sup>5</sup> — Объединенный институт высоких температур РАН, 125412, Москва, ул. Ижорская, д. 13, строение 2

Обнаружено, что при механическом воздействии на воду возникает излучение в СВЧ-диапазоне. Это излучение было зарегистрировано при температурах воды вблизи областей фазовых переходов воды. Обнаруженный эффект может возникать в различных биоаналитических системах, связанных с движением в них водных растворов, и влиять на результаты биоаналитических измерений. Обнаруженный эффект возникновения неравновесного микроволнового излучения водной среды (являющейся основным компонентом организма) в области температуры 38—39°C, то есть в области повышенной температуры организма, которая сопровождается возникновением патологического состояния человека, может быть использован для создания новых неинвазивных методов диагностики заболеваний.

**Ключевые слова:** кластеры воды, СВЧ-излучение, механическое воздействие.

**Для цитирования:** Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015; 59(4): 78-81

Ivanov Yu.D.<sup>1</sup>, Malsagova K.A.<sup>1</sup>, Tatur V.Yu.<sup>2</sup>, Vesnin S.G.<sup>3</sup>, Ivanova N.D.<sup>4</sup>, Ziborov V.S.<sup>5</sup>

## Microwave emission from water in bioanalytical systems

<sup>1</sup> — Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

<sup>2</sup> — Foundation of Perspective Technologies and Novations, Moscow, Russia

<sup>3</sup> — RES Ltd., Moscow, Russia

<sup>4</sup> — Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia

<sup>5</sup> — Joint Institute for High Temperatures of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Mechanical stimulation of aqueous protein solution was found to be accompanied by electromagnetic radiation in the superhigh frequency range. This radiation was observed at solution temperatures near the phase transitions of water. This effect may occur in various bioanalytical systems, associated with injection of aqueous solutions in these systems, and may have impact on the results of bioanalytical measurements. The discovered effect of generation of nonequilibrium microwave emission of water medium (which is the main component of the organism) in the 38—39°C temperature range, i.e. in the range of elevated temperature of the organism (which accompanies pathological condition in humans upon inflammatory diseases, i.e., infectious etc.) may be used for development of new non-invasive methods of disease diagnostics.

**Key words:** water clusters, SHF emission, mechanical impact.

**For citation:** *Patologicheskaya Fiziologiya I eksperimentalnaya terapiya*. 2015; 59(4): 78-81

**For correspondence:** Ivanov Yu.D., e-mail: yurii.ivanov@rambler.ru

Вода является основным компонентом в организме. Она служит и основной составляющей частью растворов, используемых в биоаналитических системах. Как известно, вода представляет из себя не однородную, а сложную структуру, способную образовывать различные флуктуирующие ассоциаты, кластеры. Эти кластеры могут быть как нанокластерами с линейными размерами порядка 1 нм и с временами релаксации менее 1 нс, так и гигантскими (по сравнению с нанометровыми кластерами) гетерофазными структурами с размерами

вплоть до долей миллиметра и временами релаксации более 10 с [1]. В биомедицинских исследованиях при использовании лабораторных аналитических систем, в том числе нано- и микрофлюидных систем, таких, как оптические биосенсоры [2], нанопроводные детекторы [3], АСМ-фишинг системы [4], как правило, инициируется механическое движение водных растворов для их ввода в анализатор. Очевидно, при движении водного раствора (в потоке) происходит механическое воздействие стенок (трубок, наконечников) на раствор, и, как

**Для корреспонденции:** Иванов Юрий Дмитриевич, доктор биол. наук, проф., руководитель лаб. нанобиотехнологии ФГБНУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, e-mail: yurii.ivanov@rambler.ru

следствие, могут возникать изменения сложной структуры водного раствора. Ранее нами было обнаружено, что это сопровождается таким явлением, как генерация электрического заряда [5]. Также мы показали при анализе водных растворов с низким содержанием белка, что электрическая стимуляция в гигагерцовом диапазоне повышает эффективность концентрирования белка из объема анализируемой жидкости на поверхности [6].

Целью исследования было обнаружение электромагнитного излучения воды при его механическом возбуждении в гигагерцовом диапазоне в разных температурных диапазонах. Температурные диапазоны исследований были выбраны исходя из того, что наиболее критические эффекты будут проявляться в условиях, когда водная среда испытывает большие изменения физико-химических характеристик, а именно, вблизи областей фазовых переходов [7]:

- 1) «низкотемпературный» диапазон — вблизи температуры плавления льда;
- 2) «среднетемпературный» диапазон комнатной температуры, при которой проводятся многие биологические эксперименты;
- 3) «высокотемпературный» диапазон, около  $37^{\circ}\text{C}$  — температура функционирования человеческого организма.

В результате исследований было обнаружено СВЧ-излучение воды (генерация) после механического воздействия на нее в трех выбранных температурных диапазонах: при температурах  $\sim 7^{\circ}\text{C}$ ,  $\sim 22^{\circ}\text{C}$  и  $\sim 39^{\circ}\text{C}$ .

### Методика

Деионизованная, ультрачистая вода была получена на установке Milli-Q System (Millipore, USA).

#### *Измерение яркостной температуры в СВЧ-диапазоне и ИК-диапазоне*

Известно, что в состоянии термодинамического равновесия любая среда излучает сплошной спектр, в том числе в инфракрасном и в СВЧ-диапазонах. Интенсивность излучения в каждом из этих диапазонов выражается через величину яркостной температуры. В состоянии равновесия яркостная температура измеренная в СВЧ-диапазоне ( $T_{\text{свч}}$ ), равна яркостной температуре измеренной в ИК-диапазоне ( $T_{\text{ик}}$ ).

В общем случае, зависимость яркостной температуры среды от времени в разных диапазонах может различаться, что указывает на появление неравновесного излучения.

В работе проводился мониторинг изменения соотношения величин  $T_{\text{свч}}$  и  $T_{\text{ик}}$  после механического воздействия на воду. Для измерений был использован радиометр RTM-01 RES (Россия) с помощью которого определялось электромагнитное излучение сре-

ды:  $T_{\text{свч}}$  — в случае измерений в СВЧ-диапазоне и  $T_{\text{ик}}$  — в случае измерений в ИК-диапазоне. СВЧ-диапазон составлял 3,4—4,2 ГГц (или 7,1—8,8 см), ИК-диапазон составлял 8—13 мкм. Для регистрации излучения использовалась штыревая антенна, соединенная с радиотермометром. Точность измерения температуры составляла  $0,1^{\circ}\text{C}$ .

#### *Механическое возбуждение воды*

Механическое возбуждение воды осуществлялось посредством пипетирования (инъекции) раствора ( $V = 1$  мл) в измерительной ячейке. В качестве начальной температуры измерений использовалось начальное значение  $T_{\text{ик}}$  до пипетирования. Общий объем раствора наполнения ячейки составлял 6 мл. Исследования проводились при следующих температурах: «низкотемпературный» диапазон ( $T_{\text{ик}} \sim 5\text{—}7^{\circ}\text{C}$ ); «среднетемпературный» диапазон ( $T_{\text{ик}} \sim 20\text{—}22^{\circ}\text{C}$ ); «высокотемпературный» диапазон ( $T_{\text{ик}} \sim 36\text{—}42^{\circ}\text{C}$ ).

При пониженной температуре — измерительная ячейка устанавливалась в охлажденную водяную баню. Для установления температуры в «высокотемпературном» диапазоне также использовалась водяная баня с термостатом.

### Результаты и обсуждение

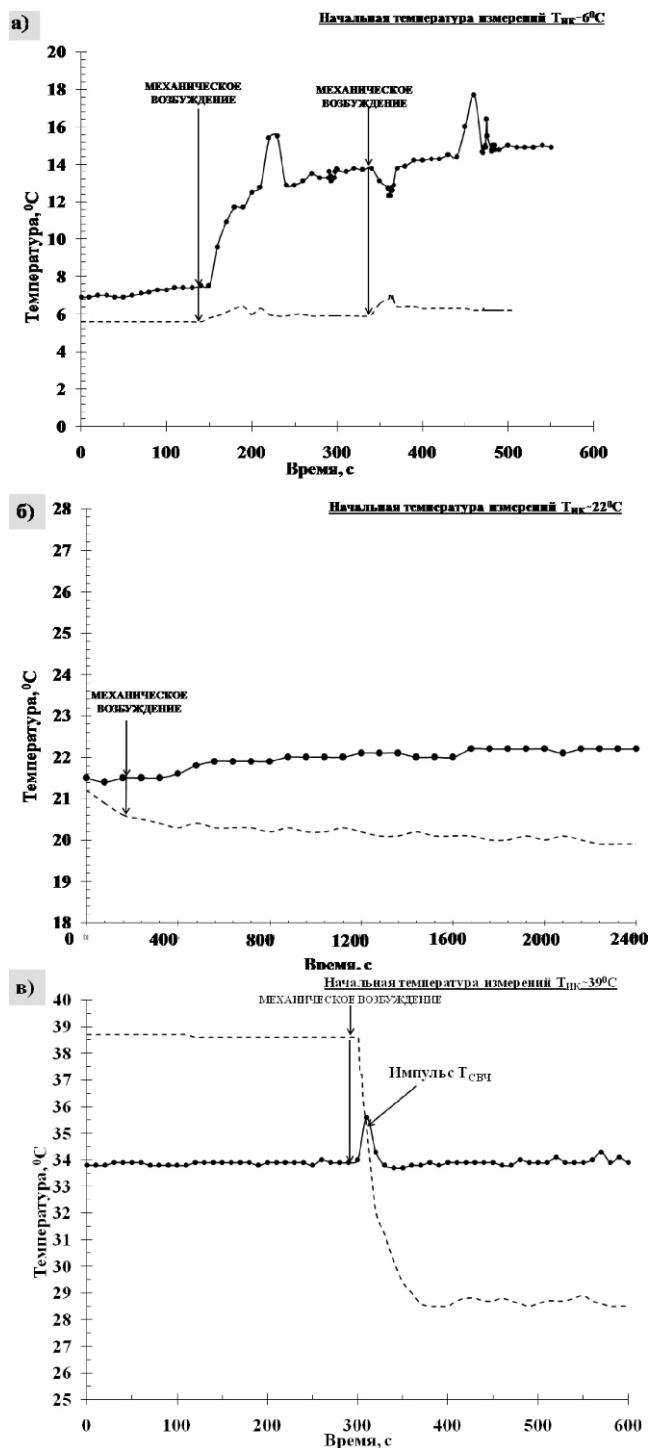
Основные результаты экспериментов приведены на рисунке. Начальное значение  $T_{\text{ик}}$  использовалось в качестве температуры воды, при которой проводился эксперимент, т.е. для отнесения температурных условий эксперимента к одному из указанных выше температурных диапазонов.

#### *«Низкотемпературный» диапазон*

На рис. а представлен пример результата эксперимента в этом температурном диапазоне для воды. Как видно, наблюдается резкий ступенчатый рост  $T_{\text{свч}}$ , включающий в себя импульсное возрастание величины с  $7,5^{\circ}\text{C}$  до  $15^{\circ}\text{C}$  после механического воздействия. Общее увеличение  $\Delta T_{\text{свч}}$  составило  $\sim 7^{\circ}\text{C}$ . При этом величина  $T_{\text{ик}}$  незначительное меняется от времени вблизи  $5^{\circ}\text{C}$  ( $\Delta T_{\text{ик}} \sim 1^{\circ}\text{C}$ ). Это означает, что возникает неравновесное СВЧ-излучение воды после ее перемешивания, то есть после механического возбуждения.

#### *«Среднетемпературный» диапазон*

При  $22^{\circ}\text{C}$  для воды после ее механического возбуждения наблюдается плавный рост СВЧ-сигнала  $T_{\text{свч}}$  ( $\Delta T_{\text{свч}} \sim 0,5^{\circ}\text{C}$ ) в течение 20 мин, при практически неизменном наклоне базовой линии  $T_{\text{ик}}$  (рис. б). Это означает, что наблюдается появление плавно нарастающей СВЧ-генерации воды после ее механического возбуждения.



Результаты измерения яркостной температуры в СВЧ-диапазоне  $T_{свч}$  (сплошная линия) и в инфракрасном диапазоне  $T_{ик}$  (прерывистая линия) в воде. Вертикальными стрелками указан момент механического воздействия на жидкость:

а — низкотемпературный диапазон; б — среднетемпературный диапазон; в — высокотемпературный диапазон. По оси X — время измерений, минуты; по оси Y — величина яркостной температуры, градусы.

Как показано на рис. в, после механического возбуждения воды наблюдалось импульсное увеличение  $T_{свч}$  на  $\sim 0,7^{\circ}C$  в течение 20 с и последующий спад до прежнего уровня. При этом  $T_{ик}$  резко спадала (на  $5\text{—}10^{\circ}C$ ), после чего такой пониженный уровень  $T_{ик}$  наблюдался в течение 300 с. То есть, наблюдалось значительное расхождение  $T_{свч}$  и  $T_{ик}$  после механического перемешивания среды, что означает появление неравновесного СВЧ-излучения.

Таким образом, было показано, что при механическом возбуждении жидкости наблюдалось изменения соотношения уровня СВЧ-излучения и уровня ИК-излучения вблизи фазовых переходов воды. Причем изменение уровня неравновесного СВЧ-излучения при возбуждении жидкости было разным для разных областей фазовых переходов. Так, для воды в области комнатных температур  $T_{ик} = 22^{\circ}C$  наблюдалось постепенно нарастающее СВЧ-излучение. Нарастание СВЧ-излучения связано с тем, что при механическом возбуждении жидкости инициируется изменение содержания льдоподобных структур в этой жидкости. А энергия преобразования ледовых кластеров выделяется в виде СВЧ-излучения. Частота генерации этого излучения соответствует вращательным переходам воды и гидроксила [9]. Новое явление вращения макромолекул в воде, как в газе, было обнаружено недавно [10, 11]. Эта гипотеза подтверждается результатами измерения СВЧ-излучения в области пониженных температур  $T_{ик} \sim 6^{\circ}C$ . В этой области при механическом возбуждении жидкости наблюдается скачкообразное увеличение  $T_{свч}$  на  $\Delta T_{свч} \sim 6^{\circ}C$ , что на порядок больше, чем в области комнатной температуры. В соответствии с предложенной гипотезой, такое скачкообразное увеличение  $T_{свч}$  ожидаемое, т.к. вероятность преобразования больших льдоподобных структур в области низких температур больше, чем в области комнатных температур. В области высоких температур порядка  $T_{ик} \sim 39^{\circ}C$  также наблюдается появление уровня неравновесного СВЧ-излучения после механического возбуждения жидкости. Обнаруженный эффект возникновения неравновесного микроволнового излучения водной среды, являющейся основным компонентом крови, в области повышенной температуры организма, которая сопровождается возникновение патологического состояния человека при воспалительных заболеваниях например, инфекционных и др., может быть использован для создания новых неинвазивных серологических диагностик заболеваний. Следует сказать, что уже созданы диагностики по выявлению ряда патологических заболеваний на основе анализа СВЧ-излучения тканей пациента [13].



Обнаружено излучение воды в СВЧ-диапазоне после механического воздействия на нее. Характер и величина изменения уровня СВЧ-излучения отличаются для разных температурных диапазонов.

Вода является основным переносчиком веществ в организме, ее движение лежит в основе работы различных систем организма, в том числе сердечно-сосудистой. С этой точки зрения интересно отметить, что в области пониженных температур воды ( $6^{\circ}\text{C}$ ) наблюдается выход из анабиоза земноводных и ступенчатое существенное повышение СВЧ-излучения. То есть, можно предположить, что выход из анабиоза животных может быть связан и сопровождаться неравновесным СВЧ-излучением.

При комнатной температуре ( $\sim 22^{\circ}\text{C}$ ) наблюдается максимальная функциональная активность некоторых ферментативных систем почвенных бактерий, как нами было показано ранее с помощью АСМ для cytochrome P450BM3 системы из *Bacillus megaterium* [12]. Также эта температура комфортна для человека.

При повышенных температурах, порядка  $38\text{—}39^{\circ}\text{C}$ , когда наблюдается патологическое состояние человека при протекании воспалительных процессов, наблюдается генерация неравновесного СВЧ-излучения, которое, возможно, связано с реакцией организма человека на заболевание.

Обнаруженные эффекты генерации СВЧ в воде могут быть полезны для создания новых методов диагностики состояния биологических сред, создание новых диагностик заболеваний, приводящих к патологическим состояниям человека. Также, описанное явление может использоваться для создания новых лекарств, обладающих повышенной эффективностью.

*Работа была поддержана Программой фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013—2020 годы и гранта РФФИ 15-04-08368а.*

## References

- 1 Fesenko E.E., Terpugov E.L. About the unusual properties of water in a thin layer. *Biofizika*. 1999; 44(1): 5-9. (in Russian)
- 2 Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Eldarov M.A., Skryabin K.G., Lehnerer M., Schulze J. et al. An optical biosensor study of the parameters and role of hydrophobic tails of cytochrome P450 cytochromes. P450B4, b5 and NADPH-flavoprotein in complex. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1997; 42: 731-7.
- 3 Ivanov Yu.D., Pleshakova T.O., Kozlov A.F., Malsagova K.A., Krohin N.V., Shumyantseva V.V., et al. SOI nanowire for the high-sensitive detection of HBsAg and a-fetoprotein. *Lab Chip*. 2012; 12: 5104-11.
- 4 Archakov A., Ivanov Yu., Lisitsa A., Zgoda V. AFM fishing nanotechnology is the way to reverse the Avogadro number in proteomics. *Proteomics*. 2007; 7: 4-9.
- 5 Ivanov Yu., Pleshakova T., Malsagova K., Kozlov A., Kaysheva A., Kopylov A., et al. Highly sensitive protein detection by combination of atomic force microscopy fishing with charge generation and mass spectrometry analysis. *FEBS*. 2014; 20: 4705-17.
- 6 Ivanov Yu.D., Pleshakova T.O., Malsagova K.A., Kaysheva A.L., Kopylov A.T., Izotov A.A. et al. AFM-based protein fishing in the pulsed electric field. *Biochemistry (Moscow) Suppl. Series B: Biomedical Chemistry*. 2015; 9(2): 121-9.
- 7 Kholmanskiy A. Two types of anomalous thermodynamics of water. *Apriori. Seriya: Estestvennye i Technicheskie nauki*. 2015; 1: 1-17. (in Russian)
- 8 Fasano M., Curry S., Terreno E., Galliano M., Fanali G., Narciso P., et al. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life*. 2005; 57(12): 787-96.
- 9 Perchin S.M. Signal exchange between bio-objects on the principle of modulation of the carrier: a coherent radiation of space OH (1.6-1.7 GHz) and H<sub>2</sub>O (22.3 GHz) masers. *Sovetskiy fizik*. 2010; 03(80): 52-9. (in Russian)
- 10 Bunkin A.F., Pershin S.M., Husainova R.S., Potehin S.A. Spin-isomer selectivity of water molecules upon hydration of DNA. *Biofizika*. 2009; 54(3): 369-401. (in Russian)
- 11 Pershin S.M., Bunkin A.F., Anisimov N.V., Pirogov Yu.A. Water enrichment by H<sub>2</sub>O ortho-isomer: four-photon and NMR spectroscopy. *Laser Physics*. 2009; 19(3): 410-3.
- 12 Ivanov Y.D., Bukharina N.S., Pleshakova T.O., Frantsuzov P.A., Krokhin N.V., Ziborov V.S., Archakov A.I. Atomic force microscopy visualization and measurement of the activity and physicochemical properties of single monomeric and oligomeric enzymes. *Biophysics*. 2011; 56(5): 892-6.
- 13 Vesnin S.G. *The antenna applicator and a device for determining the temperature changes and detection of cancer risk*. Patent 2008151958/14, RF; 2010. (in Russian).

Поступила 02.11.15

## Сведения об авторах:

Мальсагова Кристина Ахмедовна (Malsagova K.A.), мл. науч. сотр. лаб. нанобиотехнологии, ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»

Татур Вадим Юрьевич (Tatur V.Yu.), исполнительный директор, Фонд перспективных технологий и инноваций  
Веснин Сергей Георгиевич (Vesnin S.G.), канд. техн. наук, доцент, ООО «Фирма РЭС», генеральный директор

Иванова Нина Дмитриевна (Ivanova N.D.), преподаватель, ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина»

Зиборов Вадим Серафимович (Ziborov V.S.), канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. лаб. №1.1.1. — ударно-волновых воздействий, «Объединенный институт высоких температур РАН»

Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Ястребов А.П.

## **Влияние экстремальных факторов на хоуминг мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток**

ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет», 620000, г.Екатеринбург, ул. Репина, д. 3  
ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», 620000, г.Екатеринбург, ул. Соболева, д. 21

В данном исследовании изучался хоуминг мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в условиях воздействия экстремальных факторов: после лучевой нагрузки, острой кровопотери. Поглощенная доза ионизирующего излучения составила 4,0 Гр (вызывает острую лучевую болезнь у мышей), острая кровопотеря была вызвана кровопусканием из хвостовой вены мыши в объеме 2% от массы тела животного. Для метки ММСК использовали флуорохром DAPI, готовый к использованию. Эксперименты выполнены на 60 зрелых лабораторных мышках-самцах возраста 6–8 месяцев, массой 20–25 г. Эксперименты по получению культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из плаценты (хорион) выполнены на лабораторных мышках-самках в возрасте 3–4 месяцев при сроке гестации 14 сут. Введение суспензии ММСК осуществлялось в дозе 6 млн клеток/мышь, суспендированные в 0,2 мл 0,9% раствора NaCl. Контрольной группе лабораторных животных трансплантация ММСК проводилась также в количестве 6 млн клеток/мышь. Производилась оценка тканевого химеризма в периферической крови, костном мозге, селезенке, тонком кишечнике, печени, легких, почках, сердце через 1 и 24 ч после трансплантации меченых клеток. Было установлено существенное снижение содержания меченых ММСК в периферической крови при экстремальном воздействии, что свидетельствует о миграции трансплантированных клеток в поврежденные ткани. При этом хоуминг трансплантированных ММСК реализуется преимущественно в те ткани, которые подверглись наибольшему повреждению.

**Ключевые слова:** хоуминг, трансплантация, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, экстремальные факторы.

**Для цитирования:** Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015; 59(4): 82-86.

Maklakova I.Yu., Grebnev Y.D., Yastrebov A.P.

## **The influence of extreme factors on homing multipotent mesenchymal stromal cells**

«Ural state medical University», Department of pathological physiology, 620000, Ekaterinburg, Repin street, 3  
«Institute of medical cell technologies», 620000, Ekaterinburg, Soboleva str., 21

In this study, we studied homing multipotent mesenchymal stromal cells under influence of extreme factors: after radiation exposure, acute blood loss. Absorbed dose ionizing radiation amounted to 4.0 G (causes acute radiation sickness in mice), acute blood loss was caused by bleeding from the tail vein of the mouse in the amount of 2% of the body weight of the animal. Label MMSC used fluorochrome DAPI, ready to use. The experiments were performed on 60 Mature mice (males) age 6–8 months, weighing 20–25 g. Experiments on the culture of multipotent mesenchymal stromal cells from the placenta (chorion) performed on laboratory mice female at the age of 3–4 months in the gestation period of 14 days. Introduction suspensions of MMSC was carried out at a dose of 6 million cells/mouse, suspended in 0.2 ml 0.9% NaCl solution. The control group of laboratory animals MMSC transplantation was carried out also in the amount of 6 million cells/mouse. The assessment was made of tissue chimerism in the peripheral blood, bone marrow, spleen, small intestine, liver, lung, kidney, heart after 1 and 24 hours after transplantation of labeled cells. It was found a significant decrease in the content of labeled MMSC in the peripheral blood at extreme impact, indicating a migration of the transplanted cells in the damaged tissue. Homing transplanted MMSC is realized mainly in those tissues that underwent the most damage.

**Key words:** homing, transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells, extreme factors.

**For citation:** Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya. 2015; 59(4): 82-86

**For correspondence:** Grebnev Y.D., e-mail: dr-grebnev77@mail.ru

Проблема клеточного восстановления после воздействия повреждающего фактора продолжает оставаться актуальным вопросом современной биологии и медицины. Известно, что активация компенсаторно-приспособительных механизмов после воздействия экстремальных факторов на организм может приводить к восстановлению специфических функций, выполняемых данной тканью [1, 2]. Одна из основных целей регенеративной медицины — понять механизмы, по которым трансплантация клеток с высоким регенераторным потенциалом приводит к регенерации поврежденных тканей [3, 4]. Эти механизмы реализуются на основе хоуминга, пластичности трансплантированных клеток, слияния с клетками реципиента, паракринными механизмами, через формирование межклеточных контактов [5, 6]. Известно, что поврежденные ткани способны индуцировать выработку хемоаттрактанта для мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) — stromal derived factor (SDF-1) [7—9]. Различная степень выраженности хоуминга ММСК может оказывать существенное влияние на восстановление регенерации тканей через выработку цитопротективных (белков теплового шока), противовоспалительных факторов (TGF- $\beta$ , ИЛ-10) [10].

Вышеизложенное позволило сформулировать *цель настоящего исследования* — изучить хоуминг мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в условиях воздействия экстремальных факторов: после лучевой нагрузки, острой кровопотери.

### Методика

Эксперименты выполнены на 60 зрелых лабораторных мышках-самцах возраста 6—8 мес., массой 20—25 г. Эксперименты по получению культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из плаценты (хорион) выполнены на лабораторных мышках-самцах в возрасте 3—4 мес. при сроке гестации 14 дней.

### Культура ММСК

Получение клеточной культуры ММСК производилось из хориона плаценты лабораторных животных. При этом мононуклеарная фракция клеток была получена путем последовательной механической и ферментативной (раствор акутазы (Millipore, США)) обработки ткани плаценты. С целью получения первичной культуры ММСК осуществлялся пассаж мононуклеарной фракции клеток, выделенной из ткани плаценты, в специализированной среде для культивирования ММСК в чашки Петри в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток на  $1 \text{ см}^2$ . Культивирование ММСК проводилось в условиях  $\text{CO}_2$ -инкубатора

при температуре  $37^\circ\text{C}$  с содержанием углекислого газа 5% и влажностью 90%. Через 24—48 часов инкубации не прикрепленные к дну чашки Петри клетки аспирировали [11]. Среда для культивирования ММСК добавляли к прикрепленным к пластике клеткам. Замена среды проводилась каждые 3—4 сут. до достижения клетками 70—80% конfluence. При формировании соответствующего монослоя осуществлялся пересев клеток.

Состав специализированной среды для культивирования ММСК:

MesenCult MSC Basal Medium Mouse и MesenCult™ Proliferation Supplements Mouse в соотношении 4:1. Также в состав данной среды входило 2 ммоль раствора L-глутамин и антибиотики — пенициллин 50 ед./мл и стрептомицин 50 мкг/мл.

### Идентификация ММСК

#### Дифференцировка в остеогенном направлении

Дифференцировка ММСК в остеогенном направлении включала следующую последовательность действий:

ММСК третьего пассажа были высеваны в 6-камерные планшеты (площадь лунки  $9,6 \text{ см}^2$ ; «Nunc», Германия) в концентрации  $1,0 \times 10^5$  клеток на лунку в специализированную среду для культивирования ММСК (состав указан выше).

1. Культивирование продолжалось до достижения 70—80% конfluence.

2. Аспирация специализированной среды для культивирования ММСК и замена ее на раствор, индуцирующий дифференцировку ММСК в остеогенном направлении.

Приготовление раствора, индуцирующего дифференцировку ММСК в остеогенном направлении: 10 мл среды, содержащей стимуляторы остеогенной дифференцировки — MesenCult™ Osteogenic Stimulatory Supplement добавляли к 40 мл основного раствора — MesenCult™ MSC Basal Medium (Mouse). К полученному раствору также было добавлено 0,5 мл (200 ммоль) раствора L-глутамин. Таким образом, конечная концентрация L-глутамин составляла 2 ммоль.

3. Культивирование продолжалось в течение 2 недель с заменой среды каждые трое суток.

Факт остеогенной дифференцировки подтвержден гистохимическим методом регистрации увеличения экспрессии щелочной фосфатазы, а также с помощью окраски von Kossa, выявляющей наличие минерализованного фосфата кальция.

#### Окраска на щелочную фосфатазу

Клетки трехкратно промывали 1xPBS и фиксировали 4%-ным раствором формальдегида (Sigma, США) в течение 1 ч при комнатной температуре. Фиксированные клетки промывали PBS три раза по

5 мин, после чего окрашивали на щелочную фосфатазу смесью BCIP-NBT (5-бром-4-хлор-индолил фосфат, тетразолевый синий) (Sigma, США) в течение 20—40 мин в темноте при комнатной температуре. Окрашенные препараты 3—4 раза промывали дистиллированной водой и высушивали.

#### *Реакция von Kossa*

ММСК фиксировали в метаноле 2 мин при температуре 20°C. В течение 1 ч проводили окраску 2%-ным раствором нитрата серебра ( $\text{AgNO}_3$ ) (Вектон, Россия) под 60W лампой. Окрашенные клетки быстро промывали дистиллированной водой и на 5 мин помещали в 2,5%-ный раствор тиосульфата натрия ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ). Окрашенные клетки повторно промывали дистиллированной водой и высушивали. Данная окраска позволяет выявлять нерастворимые соли кальция в межклеточном пространстве.

#### *Дифференцировка в адипоцитарном направлении*

Дифференцировка ММСК в адипоцитарном направлении включала следующую последовательность действий:

1. ММСК третьего пассажа были высеяны в 6-камерные планшеты («Nunc», Германия) в концентрации  $1 \cdot 10^5$  клеток на лунку в специализированную среду для культивирования ММСК (состав указан выше).

2. Культивирование продолжалось до достижения 70—80% конfluence.

3. Аспирация специализированной среды для культивирования ММСК и замена ее на раствор, индуцирующий дифференцировку ММСК в адипоцитарном направлении.

Приготовление раствора, индуцирующего дифференцировку ММСК в адипоцитарном направлении: 10 мл среды, содержащей стимуляторы адипоцитарной дифференцировки — MesenCult™ Adipogenic Stimulatory Supplement добавляли к 40 мл основного раствора — MesenCult™ MSC Basal Medium (Mouse). К полученному раствору также было добавлено 0,5 мл 200 ммоль раствора L-глутамин. Таким образом, конечная концентрация L-глутамин составляла 2 ммоль.

4. Культивирование продолжалось в течение 2 недель с заменой среды каждые трое суток.

Факт адипоцитарной дифференцировки подтвержден гистохимическим методом регистрации нейтральных липидных вакуолей, окрашивающихся красителем Oil Red O («Sigma», США).

#### *Окраска жирным красным (Oil Red O)*

1. Рабочий раствор Oil Red O приготовлен следующим образом: используя изопропанол был получен 0,5% раствор Oil Red O (Sigma, США) с последу-

ющим добавлением дистиллированной воды в соотношении 3:2.

2. Полученный раствор был профильтрован через фильтры 0,2 мкм.

3. Культура клеток была фиксирована в метаноле в течение 2 минут.

4. Фиксированные клетки промывали 50%-ным этанолом и окрашивали раствором жирового красного в течение 10 мин.

5. Окрашенные клетки промывали 50%-ным этанолом.

Культуры клеток исследовали на инвертированном микроскопе (UNICO, США) с использованием цифровой фотокамеры Cam V400 (Vision, Австрия).

#### *Иммуноцитохимия*

Для подтверждения принадлежности культуры к ММСК производилась окраска клеток с помощью набора антител Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit (Millipore, США), содержащего позитивные (антитела к integrin  $\beta 1$ , CD 54, collagen type I и fibronectin) и негативные маркеры (антитела к CD 14, CD 45).

Производилась дифференцировка полученной культуры в адипоцитарном и остеогенном направлениях. Состав среды, индуцирующей дифференцировку: MesenCult™ Osteogenic Stimulatory Supplement / MesenCult™ Adipogenic Stimulatory Supplement и MesenCult™ MSC Basal Medium (Mouse) в соотношении 1:4, 2 ммоль раствора L-глутамин. Факт остеогенной дифференцировки подтвержден гистохимическим методом регистрации увеличения экспрессии щелочной фосфатазы, а также с помощью окраски von Kossa, выявляющей наличие минерализованного фосфата кальция. Способность клеток дифференцироваться в адипоцитарном направлении подтверждена гистохимическим методом регистрации липидных вакуолей, окрашивающихся красителем Oil Red O.

#### *Подсчет и определение жизнеспособности клеток*

Жизнеспособность клеток была определена с помощью суправитальной окраски раствором трипанового синего. Подсчет клеток производился в 5 больших квадратах камеры Горяева (или  $\geq 100$  клеток). Жизнеспособность выделенных клеток перед трансплантацией составляла 95—97%.

В тех случаях, где не указан производитель химических реактивов были использованы реактивы фирмы StemCell Technologies (Канада).

Для метки ММСК использовали раствор DAPI (Millipore, США), готовый к использованию.

#### *Экстремальные воздействия*

Облучение животных проводилось на гамма-терапевтической установке типа АГАТ-С с радионуклид-

ным источником Co-60, поглощенная доза составила 4,0 Гр, мощность поглощенной дозы 20 сГр/мин. Острая кровопотеря была вызвана кровопусканием из хвостовой вены мыши в объеме 2% от массы тела животного.

При трансплантации лабораторным животным была использована культура ММСК третьего пассажа.

Внутриривенная трансплантация проводилась через 1 час после моделирования экстремального фактора. Введение суспензии ММСК осуществлялось в дозе 6 млн клеток/мышь, суспендированные в 0,2 мл 0,9% раствора NaCl. Контрольной группе лабораторных животных трансплантация ММСК проводилась также в количестве 6 млн клеток/мышь. Количество экспериментальных животных, использованных в отдельных сериях исследований, представлено в табл. 1.

#### Статистический анализ

Для каждого ряда значений показателя вычисляли среднюю арифметическую, стандартную ошибку среднего. Достоверность различий в сравниваемых выборках проведена по критерию Манна—Уитни (U) [4]. В некоторых случаях для вычисления статистической значимости полученных результатов использовался критерий  $\chi^2$ . Статистическая обработка данных проведена с помощью программного пакета SPSS Statistics (версия 17.0). Вероятность различий считалась достоверной при значениях  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

В физиологических условиях через 1 час после трансплантации меченые DAPI ММСК были обнаружены в периферической крови, костном мозге, селезенке, тонком кишечнике, печени и почках (табл. 2). В то же время в легких и сердце не выявлены меченые ММСК.

После воздействия ионизирующего излучения в дозе 4,0 Гр на фоне трансплантации ММСК выявлен существенно значимый тканевой химеризм в костном мозге, селезенке и тонком кишечнике. Так, установлено, что в костном мозге содержание трансплантированных ММСК было в 4,34 ( $p < 0,05$ ), в селезенке в 6,21 ( $p < 0,05$ ), в тонком кишечнике в 3,21 ( $p < 0,05$ ) раза больше, чем в контрольной группе.

После острой кровопотери на фоне аллогенной трансплантации ММСК выявлено преимущественное содержание введенных ММСК в костном мозге и селезенке.

В условиях воздействия экстремальных факторов в периферической крови, легких и сердце меченых DAPI ММСК не обнаружено.

В физиологических условиях через 24 часа после трансплантации меченых DAPI ММСК установлено существенное повышение введенных клеток в костном мозге (+51,2%,  $p < 0,05$ ) (табл. 3). При этом в периферической крови, легких и сердце введенные ММСК обнаружены не были. После лучевой нагрузки и острой кровопотери показатели тканевого химеризма в изучаемых органах и тканях существенно не отличались от данных контроля.

Количество экспериментальных животных, использованных в отдельных сериях исследований

	Путь введения	Количество ММСК	Количество животных
Контроль	в/в	6 млн клеток/мышь	20 шт.
Острая кровопотеря	в/в	6 млн клеток/мышь	20 шт.
Ионизирующее излучение 4,0 Гр	в/в	6 млн клеток/мышь	20 шт.

Таблица 1

Распределение меченых DAPI ММСК в органах и тканях лабораторных животных через 1 час после трансплантации,  $M \pm m$ ,  $n = 10$

	Содержание трансплантированных ММСК* $10^3$ , %		
	Физиологические условия	Ионизирующее излучение, 4,0 Гр	Острая кровопотеря
Кровь	19,13 $\pm$ 3,62	Нет	Нет
Костный мозг	0,41 $\pm$ 0,07	1,78 $\pm$ 0,34*	1,56 $\pm$ 0,18*
Селезенка	0,38 $\pm$ 0,05	2,36 $\pm$ 0,82*	1,14 $\pm$ 0,21*
Тонкий кишечник	0,19 $\pm$ 0,06	0,61 $\pm$ 0,07*	0,24 $\pm$ 0,04
Печень	0,33 $\pm$ 0,07	0,38 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,05
Почки	0,73 $\pm$ 0,14	0,64 $\pm$ 0,18	0,97 $\pm$ 0,08
Легкие	Нет	Нет	Нет
Сердце	Нет	Нет	Нет

Таблица 2

Примечание. \* — отличие от группы контрольных животных, достоверно с  $p < 0,05$

Распределение меченных DAPI ММСК в органах и тканях лабораторных животных через 24 часа после трансплантации,  $M \pm m, n = 10$

Органы и ткани	Содержание трансплантированных ММСК* $10^3, \%$		
	Физиологические условия	Ионизирующее излучение, 4,0 Гр	Острая кровопотеря
Кровь	Нет	Нет	Нет
Костный мозг	$0,62 \pm 0,09^*$	$1,55 \pm 0,47$	$1,31 \pm 0,15$
Селезенка	$0,56 \pm 0,04$	$1,8 \pm 0,6$	$1,46 \pm 0,28$
Тонкий кишечник	$0,34 \pm 0,08$	$0,7 \pm 0,09$	$0,11 \pm 0,03$
Печень	$0,42 \pm 0,04$	$0,35 \pm 0,07$	$0,48 \pm 0,08$
Почки	$0,85 \pm 0,06$	$0,69 \pm 0,56$	$0,72 \pm 0,12$
Легкие	Нет	Нет	Нет
Сердце	Нет	Нет	Нет

Примечание. \* — отличие от группы контрольных животных, достоверно с  $p < 0,05$

Таким образом, можно предположить, что резкое снижение содержания меченых ММСК в периферической крови при экстремальном воздействии отражает быстрый их выход в поврежденные ткани. При этом хоуминг трансплантированных ММСК реализуется преимущественно в те ткани, которые подверглись наибольшему повреждению.

## References

1. Alchinova I.B., Arhipova E.N., Medvedeva Ju.S., Cherepov A.B., Karganov M.Ju. Dinamika izmenenija fiziologicheskikh pokazatelej myshey s razlichnoj radiochuvstvitelnost'ju posle ostrogo gamma-obluchenija. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2014; 157(2): 150-4. (in Russian)
2. Grebnev D.Ju. *Vlijanie citoprotektivnoj terapii tizolem na processy regeneracii mieloidnoj tkani i jepitelija toshhej kishki pri vozdeystvii ionizirujushhego izluchenija*: dis. na soiskanie uchenoj stepeni kandidata medicinskih nauk: 14.00.16 / Grebnev Dmitrij Jur'evich. — GOUVPO «Ural'skaja gosudarstvennaja medicinskaja akademija» Ekaterinburg, 2006; 208 s. (in Russian)
3. Maklakova I.Ju. *Vlijanie mul'tipotentnyh mezenhimal'nyh stromal'nyh kletok, vydelennyh iz placenty, na regeneraciju bystroobnovljajushhihsja tkanej zrelyh i staryh laboratornyh zhivotnyh pri vozdeystvii jekstremal'nyh faktorov: dis. na soiskanie uchenoj stepeni kandidata medicinskih nauk*. GOUVPO «Ural'skaja gosudarstvennaja medicinskaja akademija», Ekaterinburg, 2010. (in Russian)
4. Jastrebov A.P., Grebnev D.Ju., Maklakova I.Ju. Jeksperimental'noe obosnovanie ispol'zovanija sochetannoj transplantacii stvolovyh kletok dlja korrekcii regeneracii bystroobnovljajushhihsja tkanej posle lucheвого povrezhdenija. *Vestnik Ural'skoj medicinskoj akademicheskoy nauki*. 2012 2(39): 141. (in Russian)
5. Poveshhenko A.F., Poveshhenko O.V., Konenkov V.I. Sovremennye dostizhenija v sozdanii metodov izuchenija migracii stvolovyh kletok. *Vestnik Rossijskoj akademii meditsinskikh nauk*. 2013; 9: 46-52. (in Russian)
6. Minguell J.J., Erices A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. *Experimentalnaya biologiya i meditsina*. 2006; 231(1): 39-49. (in Russian)
7. Maklakova I.Ju., Grebnev D.Ju., Jastrebov A.P. *Sposob vosstanovlenija mieloidnoj tkani staryh laboratornyh zhivotnyh posle vozdeystvija ionizirujushhego izluchenija*. № 2008152842/14, zjavl. 30.12.2008; opubl. 20.07.2010 // Izobretenija. Poleznye modeli. 2010. Bjul. № 20 (III ch.). S 790. (in Russian)
8. Grebnev D.Ju. Perspektiva primenenija sochetannoj transplantacii stvolovyh kletok dlja vosstanovlenija gemopozjeza. *Vestnik Ural'skoj meditsinskoj akademicheskoy nauki*. 2012; 3 (40): 67-8. (in Russian)
9. Lange C., Brunswig-Spickenheier B., Cappallo-Obermann H. et al. Radiation rescue: mesenchymal stromal cells protect from lethal irradiation. *PLoS ONE*. 2011; 6: e14486.
10. Glanc S.A. *Mediko-biologicheskaja statistika*. M.: Praktika, 1999; 459 s. (in Russian)
11. Ahn JY, Park G, Shim JS, et al. Intramarrow injection of beta-catenin-activated, but not naive mesenchymal stromal cells stimulates self-renewal of hematopoietic stem cells in bone marrow. *Exp Mol Med*. 2010; 42: 122-31.

Поступила 07.08.15

## Сведения об авторах:

Маклакова Ирина Юрьевна, канд. мед. наук, науч. сотр. ГБУЗСО «Институт медицинских клеточных технологий», ассистент каф. патологической физиологии ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава России

Ястребов Анатолий Петрович, доктор мед. наук, проф., ГБУЗСО «Институт медицинских клеточных технологий», зав. каф. патологической физиологии ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава России

Аниховская И.А.<sup>1,2</sup>, Двоеносов В.Г.<sup>3</sup>, Жданов Р.И.<sup>3,6</sup>, Кубатиев А.А.<sup>1</sup>, Майский И.А.<sup>2,4</sup>,  
Маркелова М.М.<sup>2</sup>, Мешков М.В.<sup>2,4</sup>, Опарина О.Н.<sup>2</sup>, Салахов И.М.<sup>1,2</sup>, Яковлев М.Ю.<sup>1,2,5</sup>

## Психоэмоциональный стресс как клиническая модель начальной фазы общего адаптационного синдрома

<sup>1</sup> — ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

<sup>2</sup> — Институт общей и клинической патологии ООО КДО РАЕН, 127083, Москва, ул. Нижняя Масловка, д. 19

<sup>3</sup> — Институт фундаментальной медицины и биологии, ФГАОУВО Казанский федеральный университет, 420008, г.Казань, ул. Кремлевская, д. 8

<sup>4</sup> — Московский государственный медико-стоматологический университет, 127473, Москва, ул. Делегатская 20

<sup>5</sup> — Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1

<sup>6</sup> — Московский педагогический государственный университет, 119991, Россия, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1/1

**Введение.** *Общий адаптационный синдром (ОАС), в основе развития которого лежит стресс, является обязательным компонентом патогенеза многих заболеваний и синдромов. Однако патогенез ОАС до настоящего времени рассматривается исключительно с эндокринологических позиций. Это касается в первую очередь начальной фазы ОАС, клинической моделью для изучения которой, может быть психоэмоциональный стресс (ПЭС), изучавшийся нами в трёх группах волонтеров. Методика. Первая группа состоит из 25 студентов, находившихся в ожидании непривычной для них физической нагрузки (17 мужчин) и дебюта на сцене (8 женщин). Вторая — из 48 детей (2—14 лет) ожидавших «плановое» оперативное вмешательство. Третья состоит из 80 студентов (41 женщина и 39 мужчин) во время экзамена. В сыворотки крови волонтеров определялись (в различных сочетаниях) показатели концентрации кортизола, эндотоксина (ЭТ), активности антиэндотоксинового иммунитета (АЭИ) и системы гемостаза. Результаты. В результате проведенного исследования нами обнаружены лабораторные признаки ПЭС у 92% студентов первой, 58% детей второй и 21% студентов третьей (чаще у женщин) группы исследования. У 13 (52%) добровольцев первой группы повышалась концентрация ЭТ со значимым увеличением средних общегрупповых показателей (с  $0,84 \pm 0,06$  до  $1,19 \pm 0,04$  ЕУ/мл). У детей второй группы средние общегрупповые показатели концентрации ЭТ ещё более существенно увеличивались (с  $0,42 \pm 0,02$  до  $1,63 \pm 0,11$  ЕУ/мл), что сопровождалось активацией системы гемостаза, степень которой была в прямой зависимости от уровня ЭТ в общем кровотоке и активности АЭИ. Экзаменационный стресс у третьей группы волонтеров сопровождался активацией пламенного звена системы гемостаза, выразившейся в увеличении начальной скорости тромбообразования и уменьшения времени (лаг-период) его начала у 26% женщин и 15% мужчин (метод тромбодинамики). Выводы. Результаты исследования свидетельствуют о возможности использования ПЭС в качестве клинической модели для изучения начальной фазы ОАС, выявления роли избытка кишечного ЭТ в общем кровотоке (эндотоксиновой агрессии) в индукции системного воспаления, вероятность участия которого в инициации ОАС весьма вероятна.*

**Ключевые слова:** *общий адаптационный синдром, стресс, эндотоксин, воспаление.*

**Для цитирования:** *Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015; 59(4): 87-92.*

Anikhovskaya I.A.<sup>1,2</sup>, Dvoenosov V.G.<sup>3</sup>, Zhdanov R.I.<sup>3,6</sup>, Koubatiev A.A.<sup>1</sup>, Mayskiy I.A.<sup>2,4</sup>,  
Markelova M.M.<sup>2</sup>, Meshkov M.V.<sup>2,4</sup>, Oparina O.N.<sup>2</sup>, Salakhov I.M.<sup>1,2</sup>, Yakovlev M.Yu.<sup>1,2,5</sup>

## Emotional stress as a clinical model to study the pathogenesis of the initial phase of the general adaptation syndrome

<sup>1</sup> — Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Sciences, 125315, Moscow, Russia, Baltiyskaya str., 8

<sup>2</sup> — Institute of General and Clinical Patology of Clinical Diagnostic Society, Russian Academy of Sciences, 19, Nizhnyaya Maslovka, Moscow, Russia (www.immunitet.ru)

<sup>3</sup> — Institute of Fundamental Medicine and Biology (IFMB), Kazan (Volga region) Federal University, Kazan University, KFU, 18 kremlyevskaya St., Kazan 420008, Russia (inter@kpfu.ru)

<sup>4</sup> — Moscow State Medical Stomatological University n.a. A. I. Evdokimov, 20/1 Delegatskaya, Moscow, Russia

<sup>5</sup> — Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), Ostrovitianov str. 1, Moscow, Russia (rsmu@rsmu.ru)

<sup>6</sup> — Moscow State Pedagogical University, 1/1 M. Pirogovskaya Str., Moscow, 119991, Russia (ums@mpgu.edu)

**Для корреспонденции:** *Аниховская И.А., канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. системной эндотоксинемии и шока ФГБНУ «НИИ Общей патологии и патофизиологии», главный врач Института общей и клинической патологии РАЕН, e-mail: 5129118@mail.ru*

**Introduction:** General adaptation syndrome (GAS), the basis of the development of which is stress phenomenon, is an essential component of the pathogenesis of many diseases and syndromes. However, the pathogenesis of GAS hitherto is considered exclusively from the endocrinological viewpoint. This relates primarily to the initial phase of the GAS, a clinical model for the study of which may be psycho-emotional stress (PES), which we studied using three groups of volunteers. **Methods:** The first one consists of 25 students who were waiting for unaccustomed physical activity (17 men) and play debut on the stage (8 women). The second group consists of 48 children (2–14 years) who expected for «planned» surgery. The third group of volunteers is made up of 80 students (41 women and 39 men) during the first exam. The concentration of cortisol, endotoxin (ET), the activity of antiendotoxin immunity (AEI) and the haemostatic system parameters were determined in the blood serum of volunteers in various combinations. **Results:** We found laboratory evidence for PES at 92% of students of the first group, 58% of children of the second one and in 21% of students of the third group of volunteers (mostly women). The concentration of ET increased at 13 (52%) volunteers of the first group with a significant increase of average indicators in the whole group (from  $0,84 \pm 0,06$  to  $1,19 \pm 0,04$  EU / ml). At children of the second group, the average concentration of ET increased even more significantly (from  $0,42 \pm 0,02$  to  $1,63 \pm 0,11$  EU / ml), which was accompanied by the activation of the hemostasis system. A degree of the activation was directly dependent on the level of ET in the general circulation and on an activity of AEI. Examination stress in the third group of volunteers is accompanied by activation of plasma hemostasis (increased initial thrombosis rate and reduced the time it starts, lag-period) in 26% of female students and 15% of male students. **Conclusion:** We suggest that it is possible to use the PES as a clinical model for studying the initial phase of the GAS, examine the role of excess of intestinal ET in the general blood circulation (endotoxin aggression) in the induction of systemic inflammation, which is very likely participated in the initiation of the GAS.

**Key words:** General adaptation syndrome, stress, endotoxin, inflammation.

**For citation:** *Patologicheskaya Fiziologiya I eksperimentalnaya terapiya. 2015; 59(4): 87-92*

**For correspondence:** Anikhovskaya I.A., e-mail: 5129118@mail.ru

Стресс представляет собой неспецифический ответ организма на любое предъявляемое ему требование, в основе развития которого лежит гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система [1, 2]. Функциональная активность этой универсальной адаптивной системы определяется её ресурсом и сроком воздействия на неё стрессора, вызывающего достаточно интенсивную афферентную импульсацию с периферии в головной мозг. Чрезмерная (или длительная по времени) активность коры головного мозга вызывает психоэмоциональный (син.: эмоциональный, психологический, информационный, ментальный, экзаменационный и др.) стресс (ПЭС), который может быть причиной развития самой разнообразной патологии или высоким фактором риска её возникновения, обострения или прогрессирования, а именно: атеросклероза, инфаркта миокарда, сахарного диабета, воспалительных заболеваний глаза, лёгких, желудочно-кишечного тракта, других органов и систем [3—9].

ПЭС может индуцировать воспаление и в 40% являться единственным фактором риска развития атеросклероза [10, 11] или, по меньшей мере, влиять на течение хронических воспалительных заболеваний [12]. Ряд авторов отмечает синергический эффект воспаления и стресса [13]. Взаимосвязь между стрессом и воспалением достаточно убедительно иллюстрируется на примере депрессии. Ряд авторов считает депрессию одним из проявлений воспаления [14, 15], что подтверждается способностью провоспалительных цитокинов инициировать развитие её клинической симптоматики [16], тогда как другие исследователи обнаружили способность антидепрессантов

устранять воспаление [17]. Последнее представляется принципиально важным, поскольку позволяет квалифицировать ПЭС, как первопричину развития воспаления, а его медиаторы как фактор усугубляющий течение депрессии и развития психосоматической патологии, что косвенно подтверждается ранее обнаруженным фактом активации миелиоцитарного ростка костного мозга и гемостаза у волонтеров в экзаменационный период [18—20]. Однако причины провоспалительного действия ПЭС неизвестны [14], что нельзя сказать о третьей фазе общего адаптационного синдрома (ОАС), сопровождающейся синдромом системного воспалительного ответа (ССВО), в индукции и прогрессировании которого определяющая роль принадлежит эндотоксиновой агрессии (ЭА) кишечного и/или иного происхождения [21]. Наиболее ярким свидетельством участия эндотоксина (ЭТ) в патогенезе «завершающей» фазы ОАС получены при использовании гемодиализных колонок с селективной сорбцией ЭТ [22—26], что обеспечивает значительное повышение эффективности лечения пациентов с воспалительными осложнениями после трансплантации почки и больных с абдоминальным сепсисом. Последний является фактором высокого риска прогрессирования заболеваний атеросклеротической природы [27,28], что указывает на необходимость поиска и иных средств устранения ЭА, как основополагающего фактора атерогенеза [4]. Высокая вероятность участия эндотоксинового фактора в инициации ОАС, косвенно подтверждается прямой зависимостью между приростом концентрации ЭТ в кровотоке и частотой развития реакций дизадаптации при физическом стрессе [29].



Таким образом, есть основание полагать, что кишечный ЭТ может принимать участие в инициации ОАС, индуцировать системное воспаление уже в первых фазах его развития. В связи с этим, целью нашего первого исследования по этой проблеме явилось установление перспектив использования ПЭС в качестве клинической модели для изучения начальной фазы развития ОАС.

### Методика

Материалом для анализа послужили результаты исследований, проведённые в Москве, Казани и Пензе в период с 2003—2013 гг., которые получены в трёх в группах волонтеров. Первую группу добровольцев составили 25 молодых людей в возрасте от 19 до 22 лет: 17 студентов (мужского пола) исторического факультета университета, которым впервые предстояла непривычно большая физическая нагрузка (PWC170), 4 из которых от неё отказались или по разным причинам прервали участие в эксперименте, а также 8 студенток актёрских училищ дебутирующих на сцене. Образцы крови для определения концентраций ЭТ (при помощи ЛАЛ-теста в адаптированной к клинике модификации [6, 7]) и кортизола (КЗ) (при помощи иммуноферментного анализа — ИФА) забирались дважды: за 5—7 сут. (начальная фаза) и 5—60 мин (конечная фаза) до экстремальной ситуации. У мужчин образцы крови забирались в первой половине (с 9—11 утра), у женщин — во второй половине дня (с 16—18 вечера). Вторую группу исследования составили 48 детей в возрасте 2—14 лет, поступивших в Измайловскую больницу на плановые операции по поводу варикоцеле, паховой или пупочной грыжи, которые были разделены на три подгруппы (см. раздел Результаты и обсуждение). Все дети были тщательно обследованы, показатели температуры тела и рутинных методов лабораторного анализа соответствовали нормативным. Образцы крови исследовались однократно (утром, натощак); в них определялись концентрации антиэндоксинных антител (АЭАТ) и КЗ (в ИФА), резервы связывания ЭТ полиморфноядерными лейкоцитами (ПЯЛ) и концентрация ЭТ, методами подробно описанными нами ранее [7]. Функциональное состояние системы гемостаза оценивалось электрокоагулографом Н-334 при помощи четырёх наиболее общих (основных) его показателей, а именно: Am (в условных единицах — у.е.) — максимальной амплитуды показателей гематокрита; Ao (в у.е.) — показателя структурной коагуляции, характеризующего плотность сгустка; T (секунды) — показателя хронометрической коагуляции (времени всех фаз свёртывания крови); ФА (%) — показателя фибринолитической активности. Третья группа состояла из 80 доб-

ровольцев (41 женщина и 39 мужчин) (в том числе женщины в фолликулярной фазе менструального цикла) студентов Казанского федерального университета в возрасте 18—24 года, у которых забирались пробы крови непосредственно перед первым экзаменом (1-я подгруппа: «экзаменационный стресс») и в межэкзаменационном периоде (2-я подгруппа) для определения активности системы гемостаза: параметров коагулометрии и тромбодинамики («Регистратор Тромбодинамики Т», ГемаКор, Россия) с использованием модели пространственного роста фибринового сгустка, по описанной нами ранее методике [19, 30, 32]. Показатели variability сердечного ритма и дыхательной системы регистрировались в состоянии относительного покоя в положении лежа и в активной ортопробе с использованием медицинской диагностической системы «Валента» (НПП «НЕО», С.-Петербург) как описано ранее [19, 31].

Протоколы исследований утверждались локальными этическими комитетами, и после подписания добровольцами (или их родителями) информированного согласия проводился сбор анамнестических данных и физикальное обследование волонтеров бригадой врачей для исключения наследственных заболеваний системы крови и других острых и хронических заболеваний.

Статистический анализ проводили с использованием программного пакета Statistica v.10 (StatSoft). Для небольших выборок использовались непараметрические методы анализа.

### Результаты и обсуждение

У 23 (92%) волонтеров первой группы в конечной фазе исследования перед началом физической нагрузки наблюдался значительный прирост концентрации кортизола (табл. 1). В большей степени это касалось мужчин, ожидавших непривычную для них физическую нагрузку (в 100%) и в меньшей — актрис дебутирующих на сцене (75%), с существенным увеличением средних показателей (со  $187,5 \pm 9,0$  до  $361,1 \pm 14,1$  нмоль/л). Принципиально важным представляется тот факт, что достоверно увеличивались и средние показатели концентрации ЭТ (с  $0,84 \pm 0,06$  до  $1,19 \pm 0,04$  ЕУ/мл), несмотря на то обстоятельство, что повышение содержания ЭТ в крови было зарегистрировано только у 13 из 25 волонтеров (в 52%): у 11 из 17 мужчин (в 64,7%) и 2 из 8 женщин (в 25%). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, по меньшей мере, об одном факте — ПЭС обуславливает увеличение концентрации ЭТ в общем кровотоке. А поскольку кишечный ЭТ является одним из базисных элементов управления активностью гемостаза [6], мы сочли важным изучение его показателей в следующих группах исследования.

Вторая часть нашего исследования посвящена изучению роли кишечного ЭТ в индукции «предоперационного стресса», основанного главным образом на страхе перед предстоящей операцией. Только у 20 из 48 (в 42%) детей интра- и послеоперационный периоды протекали без особенностей и потому их лабораторные показатели были использованы в качестве контрольных (первая подгруппа, 1-я строка табл. 2): уровень ЭТ в общем кровотоке составил  $0,42 \pm 0,02$  EU/ml; концентрации АЭАТ и КЭ:  $201 \pm 2,28$  у.е.о.п. и  $292 \pm 18$  нмоль/л соответственно; показатели электрокоагулограммы: Am:  $3,4 \pm 0,04$  у.е.; T:  $551 \pm 10$  с; A0  $0,4 \pm 0,02$  у.е.; ФА:  $23 \pm 1,3\%$  (табл. 2). Другие 28 пациентов в зависимости от степени психоэмоционального возбуждения были разделены на две подгруппы (вторую и третью, состоящих соответственно из 15 и 13 детей). Показатели концентрации КЭ в сыворотке второй подгруппы (2-я строка табл. 2) имели тенденцию к повышению (до  $313 \pm 5,9$  нмоль/л со значительным увеличением содержания ЭТ в общем кровотоке ( $0,98 \pm 0,06$  EU/ml) и АЭАТ (до  $272 \pm 14$  у.е.о.п.), усилением процесса коагуляции (A0 =  $0,2$  у.е.), потреблением факторов свёртывания и начальными признаками их дефицита (T =  $678 \pm 13$  с). Общее состояние пациентов оставалось удовлетворительным, температура тела нормальной, чего нельзя сказать о детях третьей подгруппы. — У шести из них предоперационное психоэмоциональное перевозбуждение сопровождалось

подъёмом температуры тела до  $37,4—37,5$ , что в двух случаях было причиной отказа от операционного вмешательства, отличались и изучаемые нами показатели. Для детей третьей подгруппы (строка 3, табл. 2) были характерны ещё более высокий уровень ЭТ ( $1,63 \pm 0,11$  EU/ml) и КЭ ( $417 \pm 19$ ), субкомпенсированная хронометрическая и структурная гипокоагуляция, проявляющаяся снижением плотности сгустка крови ( $0,9 \pm 0,1$  у.е.), дефицитом факторов свёртывания крови ( $859 \pm 28$  с) и высокой активностью фибринолитической системы крови ( $41 \pm 5,0\%$ ).

Таким образом, предоперационный ПЭС имеет место у 58% волонтеров, который сопровождается активацией системы гемостаза, выраженность которого прямо коррелирует с показателями концентрации эндотоксина в общем кровотоке. Однако использование этой разновидности ПЭС как клинической модели для изучения начальной фазы патогенеза ОАС имеет ряд серьезных ограничений и в первую очередь это касается возрастного аспекта. Для получения рандомизированных групп сравнения наиболее перспективным может быть «экзаменационный» ПЭС, принципиальную возможность использования которого мы решили установить, определив его способность влиять на активность гемостаза.

Третья группа добровольцев состояла из 80 студентов КФУ, обследованных в рамках регулярного медосмотра. Факт наличия психоэмоционального возбуждения подтвержден нами ранее [19] на основе

Таблица 1

Динамика изменения показателей концентрации эндотоксина у волонтеров перед физической нагрузкой (PWC170) и дебютом на сцене

Фаза исследования, число волонтеров	Концентрации в сыворотке крови:	
	Эндотоксина, EU/мл	Кортизола, нмоль/л
Начальная, диапазон показателей, n = 25	От 0,3 до 1,25	От 65 до 279
Начальная, средние показатели, n = 25	$0,84 \pm 0,06$	$187,5 \pm 9,0$
Конечная, диапазон показателей, n = 25	От 0,6 до 1,50	От 147 до 670
Конечная, средние показатели, n = 25	$1,19 \pm 0,04$	$361,1 \pm 14,1$
Достоверность, t-критерий	4,62	10,48
Число и процент волонтеров с повышением показателей	13 / 52%	23 / 92%

Таблица 2

Показатели концентрации в сыворотке кортизола, эндотоксина, антиэндотоксиновых антител и активности системы гемостаза у детей перед плановым операционным вмешательством

n	Показатели концентрации в сыворотке			Показатели электротромбоэластограммы			
	Кортизола нмоль/л	Эндотоксина EU/ml	Антител к ЛПС у.е.о.п	Am, у.е.	T, с	A0, у.е	ФА, %
1	$292 \pm 18^{* **}$	$0,42 \pm 0,02^{*}$	$201 \pm 2,28^{* **}$	$3,4 \pm 0,04^{**}$	$551 \pm 10^{*}$	$0,4 \pm 0,02^{*}$	$23 \pm 1,3^{*}$
2	$313 \pm 5,9^{* **}$	$0,98 \pm 0,06^{*}$	$272 \pm 14^{* **}$	$3,5 \pm 0,04^{**}$	$678 \pm 13^{*}$	$0,2 \pm 0,04^{*}$	$11 \pm 3,8^{*}$
3	$417 \pm 19^{**}$	$1,63 \pm 0,11^{*}$	$222 \pm 15^{**}$	$3,3 \pm 0,1^{**}$	$859 \pm 28^{*}$	$0,9 \pm 0,1^{*}$	$41 \pm 5,0^{*}$

Примечание. \* —  $p < 0,05$  и \*\* —  $p < 0,01$  статистически значимые различия показателей при стрессе с контролем.

Показатели гемостаза, кардиореспираторной системы и регуляции сердечного ритма обследуемых в условиях экзаменационного стресса

Изучаемые показатели	Пол	Контроль	Экзамен стресс
Частота дыхания в минуту	Муж.	15,9 ± 0,58*	34,7 ± 2,49
	Жен.	20,9 ± 1,97*	28,5 ± 2,65
Ударный объем, УО	Муж.	49,0 ± 4,20	58,8 ± 1,39
	Жен.	53,5 ± 2,20	57,3 ± 2,89
Индекс централизации (в покое), усл.ед.	Муж.	0,95 ± 0,11	1,18 ± 0,14
	Жен.	0,79 ± 0,13*	1,45 ± 0,24
Начальная скорость тромбообразования, мкм/мин	Муж.	43,0 ± 1,61	45,1 ± 1,23
	Жен.	41,3 ± 1,67*	48,7 ± 1,10
Время задержки роста сгустка, лаг-период, мин	Муж.	0,72 ± 0,07*	0,70 ± 0,04
	Жен.	0,76 ± 0,10*	0,56 ± 0,03

Примечание. \* —  $p < 0,05$  — статистически значимые различия показателей при стрессе с контролем.

совокупности физиологических данных, показателей variability сердечного ритма, полученных методом вариационной ритмокардиографии [31]. Поведенное нами исследование (табл. 3) обнаружило возможность использования этого вида ПЭС в качестве клинической модели начальных этапов ОАС.

Во время экзаменов у студентов повышается частота дыханий в минуту, частота сердечных сокращений и ударный объем. Показательно то обстоятельство, что во время экзаменов достоверно повышается индекс централизации, который отражает преобладание активности центрального контура регуляции ритма сердца над автономным, что говорит о роли центрального возбуждения у экзаменуемых студентов. Активация плазменного звена системы гемостаза была обнаружена у 17 волонтеров, что составило 21% от общего числа испытуемых: у 11 женщин (26%) и 6 мужчин (15%), что манифестировалось увеличением величины начальной скорости тромбообразования и уменьшением параметра лаг-период. Однако значимые различия в показателях начальной скорости тромбообразования (по U-критерию Манна—Уитни) в группах сравнения (до и во время экзаменов) были обнаружены только у женщин (с 41,32 до 48,74 мкм/мин,  $p = 0,03$ ), что свидетельствует о гендерных особенностях в реакции на психоэмоциональное возбуждение. Мы полагаем, что в активации гемостаза мог принять участие кишечный ЭТ, концентрация которого в общем кровотоке при физическом стрессе повышается [29].

### Заключение

Общий адаптационный синдром [1, 2], равно как и эндотоксиновая агрессия кишечного происхождения [21], являются облигатными элементами патогенеза заболеваний и синдромов, однако рассматриваются во взаимосвязи друг с другом лишь при шоковом (чаще септическом) процессе, где использование гемодиализ-

ных колонок с селективной сорбцией ЛПС значительно повышает эффективность лечения [22—26]. Начальная фаза ОАС, которая по своей сути является пограничным состоянием между физиологией (нормой) и патологией изучаются главным образом с эндокринологических позиций (так велик авторитет Ганса Селье). Вместе с тем, полученные нами результаты косвенно свидетельствуют о наличии системного воспаления уже в самом начале ОАС, наиболее вероятным индуктором которого является кишечный ЭТ. Определение роли избытка ЛПС в инициации системного воспаления уже на начальном этапе ОАС, клинической моделью которой является психоэмоциональный стресс, представляется весьма важной для минимизации его негативных последствий. Наиболее оптимальной клинической моделью для определения предполагаемой нами роли ЭТ-индуцированного системного воспаления в инициации ОАС является «экзаменационный стресс», признаки которого определяются у 21% волонтеров (чаще у женщин), поскольку позволяет организационно проще и корректнее рандомизировать (по возрастному и др. параметрам) группы для сравнения с волонтерами без признаков активации системы гемостаза.

*Работа поддержана средствами Института общей и клинической патологии КДО РАЕН и базовой части госзадания Минобрнауки/КФУ, тема 3796, бюджет 15-88.*

### References

1. Selye H.A Syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*.1936.138: 32.
2. Selye H. *Stress in Health and Disease*. Boston: Butterworths. 1976, p.1256.
3. Agadzhanyan N.And., Dvoenoso V.G. Adaptation and ethnic physiology, rehabilitation medicine: quality of life and health. In: *Selected chapters of basic and translational medicine [Izbrannyye glavy fundamentalnoy i translyatsionnoy*

meditsiny] (Zhdanov R.I., resp. ed.), Publishing house of Kazan University, Kazan; 2014: 202-43. (in Russian)

4. Anikhovskaya I.A., Kubatiev A.A., Yakovlev, M.Yu. The Endotoxin theory of atherosclerosis. *Fiziologiya cheloveka*. 2015; 41(1): 106-16. (in Russian)

5. Chizhikov N.In., Anikhovskaya I.A., Likhoded V.G., Salakhov I.M., Yakovlev M.Yu. Systemic endotoxemia in the pathogenesis of atherosclerosis. *Uspekhi sovremennoi biologii*. 2001; 121(3): 266. (in Russian)

6. Vyshegurov J.H., Anikhovskaya I.A., Batmanov Y.E., Yakovlev M.Yu. Intestinal endotoxin in the pathogenesis of inflammatory pathology of the eye and antiendotoxic component of its treatment. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2007; 1: 12-4. (in Russian)

7. Sacks M.V., Gataullin Y.K., Ivanov V.B., Yakovlev M.Yu. Endotoxin aggression as a cause postsurgery complications in pediatric surgery (new perspectives of prevention) [*Endotoksinovaya agressiya kak prichina posleoperatsionnykh oslozheniy v detskoj khirurgii (novye perspektivy profilaktiki)*] M., 2007. Ser. New medical diagnostic technologies. Book 2. (in Russian)

8. Chazov E.I. The Manual on cardiology in four volumes [*Rukovodstvo po kardiologii v chetyrekh tomakh*]. M., 2014. (in Russian)

9. Hekler E.B., Rubenstein J., Elliot J. Coups E.J. et al. Inflammatory Markers in Acute Myocardial Infarction Patients: Preliminary Evidence of a Prospective Association With Depressive Symptoms. *J. Appl. Biobehavioral Res*. 2007; 12(2): 65-81.

10. Black P.H. Stress and the inflammatory response: A review of neurogenic inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2002; 16(6): 622-53.

11. Black Ph., Garbutt L.D. Stress, inflammation and cardiovascular disease. *J. Psychosom. Res*. 2002; 52(1): 1-23.

12. Miller G.E., Cohen S., Ritchey A.K. Chronic Psychological Stress and the Regulation of Pro-Inflammatory Cytokines: A Glucocorticoid-Resistance Model. *Health Psychology*. 2002; 21(6): 531-41.

13. de Pablos R.M., Villaran R.F. Arguelles S. et al. Stress Increases Vulnerability to Inflammation in the Rat Prefrontal Cortex. *J. Neuroscience*. 2006; 26(21): 5709-19.

14. Almond M. Depression and inflammation. *Current Psychiatry*. 2013; 6: 24-32.

15. Dinan T.G. Inflammatory markers in depression. *Curr Opin Psychiatry*. 2009; 2(1): 32-6.

16. Slavich G.M., Irvin M.R. From Stress to Inflammation and Major Depressive Disorder: A Social Signal Transduction Theory of Depression. *Physiol. Bull*. 2014; 140(3): 774-815.

17. Patel A. The Role of Inflammation in Depression. Review. *Psychiatria Danubina*. 2013; 25(2): 216-23.

18. V. Kupriyanov R., Zhdanov R. I. Stress and alostaz: problems, prospects and correlations. *Journal of Higher Nervous Activity them. I. P. Pavlov*. 2014; 64(1): 21-31. (in Russian)

19. Lozhkin, A.P., Y.V. Chernovalov, Doroshov V.G. and others the Effect of emotional stress on the content of leukocytes and cromodinamica in healthy volunteers. *KAZ. Honey. Journal*. 2013; 5: 718-22. (in Russian)

20. Kupriyanov R.V., Zhdanov R.I. The eustress concept: problems and outlooks. *World J. of Med. Sciences*. 2014; 11(2): 179-85.

21. Yakovlev, M. Yu. Intestinal endotoxin and inflammation. *Dermatology. National leadership. A brief edition*. 2013. Chapter 8. P. 70-76 (in Russian)

22. Zulkarnaev A.B., Krstich M., Vatazin A.V., Gubarev, K.K. Modern etiopathogenic approach to the treatment of purulent-septic complications after kidney transplantation. *Meditsinskiy almanakh*. 2013; 5: 161-4. (in Russian)

23. Khoroshilov S.E., N Kaprun.And., Polovnikov S. G. et al. Selective absorption of endotoxin in the treatment of abdominal sepsis. *Intensive care*. 2009; 6: 83-7.

24. Antonelli M., Fumagalli R., Cruz D.N. et al. PMX endotoxin removal in the clinical practice: results from the EUPHAS trial. *Contrib Nephrol*. 2010; 167: 83-90.

25. Cavaillon J.M. Polymyxin B for endotoxin removal in sepsis. *Lancet Infect Dis*. 2011; 11(6): 426-7.

26. Sato K., Maekawa H., Sakurada M. et al. Direct hemoperfusion with polymyxin B immobilized fiber for abdominal sepsis in Europe. *Surg Today*. 2011. Vol. 41. №6. — P. 754-60.

27. Savel'ev V.S., Petukhov V.A. *Peritonitis and endotoxin aggression*. M-2012. (in Russian)

28. Savel'ev V.S., Petukhov V.A. Endothelial dysfunction: the current state of issue // *Surgery. Journal of them. N. And. Pirogov*. 2008. №1. P.3. (in Russian)

29. Anikhovskaya I.A., Oparina O.N., Yakovleva N.M., Yakovlev M.Yu. Intestinal endotoxin as a universal factor of adaptation and pathogenesis of General adaptation syndrome// *human Physiology*. 2006. Volume 32, No. 2.-P. 87-91. (in Russian)

30. Tuktamyshov R.N., Zhdanov R.I. The method of in vivo evaluation of hemostasis: spatial thrombodynamics // *Hematology*. — 2015. — V. 20, № 5 (accepted June 4, 2015).

31. Davydov D.M., Zhdanov R.I., Dvoenosov V.G., Kravtsova O.A., Voronina E.N., Filipenko M.L. Resilience to orthostasis and hemorrhage: Common effects of some genetic and conditioning factors // *Sci. Rep. Nature PG*. — 2015. — V. 5, article number 10703, 17 pp., May 29, 2015.

32. Lipets E., Ataullakhanov F. Global assays of hemostasis in the diagnostics of hypercoagulation and evaluation of thrombosis risk // *Thrombosis J*. — 2015. — V. 13, № 4. DOI: 10.1186 / s12959-015-0038-0

Поступила 02.11.15

### Сведения об авторах:

Двоеносов В.Г. — доктор биол. наук, доцент общеуниверситетской кафедры физической культуры Казанского федерального университета. E-mail: kdo@4unet.ru

Жданов Р.И. — докт. хим. наук, профессор, главный научный сотрудник, кафедра биохимии и биотехнологии, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет, E-mail: kdo@4unet.ru

Кубатиев А.А. — д.м.н., проф., acad. РАН, директор ФГБНУ «НИИ Общей патологии и патофизиологии». E-mail: aslankubatiev@gmail.com

Майский И.А. — врач, Институт общей и клинической патологии ООО КДО РАЕН, E-mail kdo@4unet.ru

Маркелова М.М. — врач, Институт общей и клинической патологии ООО КДО РАЕН, E-mail: kdo@4unet.ru

Мешков М.В. — д.м.н., доцент кафедры детской хирургии, Московский государственный медико-стоматологический университет, E-mail: kdo@4unet.ru

Опарина О.Н. — врач, Институт общей и клинической патологии ООО КДО РАЕН, E-mail: kdo@4unet.ru

Салахов И.М. — к.м.н., в.н.с. лаборатории системной эндотоксинемии и шока ФГБНУ «НИИ Общей патологии и патофизиологии», e-mail: 7261314@mail.ru

Яковлев М.Ю. — зав. лабораторией системной эндотоксинемии и шока ФГБНУ «НИИ Общей патологии и патофизиологии». Директор Института общей и клинической патологии ООО КДО РАЕН. E-mail: yakovlev-lps@mail.ru

Белусова Е.С., Микашинович З.И., Саркисян О.Г.

## **Гипоксия как патофизиологическая основа изменения метаболических процессов в эритроцитах и гепатоцитах крыс после длительного приёма симвастатина (зокора)**

ГБУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра общей и клинической биохимии №1, 344022, г.Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, д. 29

С целью оценки функционально-метаболических перестроек клеток печени и эритроцитов после длительного приёма симвастатина (Zocor, 20 мг по 1,5 мг один раз в сутки в течение трех месяцев) определяли концентрацию метаболитов гликолиза, активность ферментов углеводно-энергетического обмена и антиоксидантной защиты. Установлено, что общая метаболическая реакция на длительный приём симвастатина у интактных животных характеризуется развитием гипоксии, что подтверждается увеличением концентрации 2,3-ДФГ в эритроцитах, накоплением лактата в эритроцитах и гепатоцитах. Разнонаправленные изменения активности глутатион-зависимых ферментов, повышение активности ферментов первой линии антиоксидантной защиты свидетельствуют о напряжении защитных механизмов эритроцитов и гепатоцитов. Биохимические изменения в плазме крови отражают тенденцию к формированию синдрома цитолиза и нарушению биосинтетической функции печени. Снижение количества церулоплазмينا может быть использовано в качестве дополнительного биохимического критерия для оценки выраженности повреждения печени при длительном приёме статинов.

**Ключевые слова:** статины; гепатотоксичность; симвастатин.

**Для цитирования:** Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015; 59(4): 93-96.

Belousova E.S., Mikashinowich Z.I., Sarkysjan O.G.

## **Hypoxia as functional base of metabolic processes changes in erythrocytes and hepatocytes of rats after prolonged Simvastatin (Zokor) intake**

SBI HPO Rostov state medical university Ministry of Health protection of Russia, department of common and clinical biochemistry № 1, 344022, Rostov-on-Don, Nakhichevansky str., 29

Concentration of glycolysis metabolites, activity of enzymes of carbohydrate and energetic metabolism and antioxidant enzymes was investigated in hepatocytes and erythrocytes with the purpose of estimation of functional metabolic changes of cells rebuilding after prolonged Simvastatin intake (Zocor, 20 mg; on 1.5 mg once a day during 3 months). It was established that total metabolic reaction on prolonged Simvastatin intake at intact animals characterized by hypoxia formation, that manifested by increasing of 2,3-BPG concentration in erythrocytes, lactate accumulation in erythrocytes and hepatocytes. Different side changes of glutathione-dependent enzymes activity, activation of first line of antioxidant defense enzymes testify about tense defense mechanisms of erythrocytes and hepatocytes. Biochemical changes in blood plasma shows tendency to cytolysis syndrome formation and affection of biosynthetic liver function. Decreasing of ceruloplasmin concentration can be used as additional biochemical test in estimation of the state of liver affection at prolonged Simvastatin intake.

**Key words:** statins, hepatotoxicity, Simvastatin.

**For citation:** Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya. 2015; 59(4): 93-96

**For correspondence:** Belousova E.S., e-mail: belousovalena@mail.ru

Несмотря на многочисленные исследования, доказывающие высокую эффективность статинов, существует ряд нерешённых вопросов, связанных с их токсическим влиянием на мышцы и печень [1]. Имеющиеся в литературе данные не позволяют сформировать однозначное мнение о степени выраженности поражения печени при длительном приёме статинов, молекулярных механизмах

изменения функционального состояния гепатоцитов и их патогенетической значимости [2, 3]. Выявление особенностей сдвигов ключевых метаболических процессов в гепатоцитах после длительного приёма статинов позволит сформулировать представления о молекулярных изменениях в клетках печени и разработать способы преодоления побочных эффектов.

**Для корреспонденции:** Белусова Елена Сергеевна, канд. биол. наук, зав. каф. фармацевтической химии и фармакогнозии ГБОУ ВПО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России, e-mail: belousovalena@mail.ru

Анализ функциональной перестройки красных клеток крови, осуществляющих тесный контакт со всеми тканями, позволит определить вклад типовых патофизиологических механизмов повреждения в изменение функционального состояния гепатоцитов.

*Цель работы* — оценка функционально-метаболической перестройки клеток печени и эритроцитов экспериментальных животных после длительного приёма симвастина.

### Методика

Исследование проводилось на 70 беспородных крысах-самцах массой 300—350 г в возрасте 12—14 мес. Содержание животных соответствовало санитарным правилам, утверждённым МЗ СССР от 06.07.73 по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Животных кормили натуральными и брикетированными кормами в соответствии с нормами, утверждёнными приказом № 755 от 12.08.77 (Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики»). В процессе эксперимента животные были разделены на две группы: контрольная группа — 35 интактных животных; экспериментальная группа — 35 животных, получавших в течение 3 мес. симвастин (Zocor, 20 мг) по 1,5 мг 1 раз в сутки. По истечении срока эксперимента животных декапитировали.

Эритроциты получали из крови, стабилизированной гепарином (10 ед/мл), отделяли от лейкоцитов и тромбоцитов в 3% желатиновом растворе с последующим центрифугированием. Гомогенат печени готовили в соотношении 1 г ткани : 9 мл охлаждённого физиологического раствора, центрифугировали при 3000 об/мин. Концентрацию 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) определяли методом Лугановой И.С., Блинова М.Н. [4]. Концентрацию пировиноградной (ПВК) кислоты определяли по реакции с 2,4-динитрофенилгидрозином [5]. Концентрацию лактата определяли методом, описанным Даниловой Л.А. [6]. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (гл-6-фДГ) определяли спектрофотометрически [6]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли методом, описанным Гуревичем В.С. и др. [7]. Активность каталазы определяли по методу Королюк М.А. и соавт. в описании Микашинович З.И. и др. [8]. Активность глутатионредуктазы (ГР) определяли по скорости окисления НАДФН+Н [5]. Концентрацию восстановленного глутатиона (GSH) определяли методом Ellman G.L. [8]. Активность глутатионпероксидазы (ГПО) определяли по изменению содержания GSH в пробах до и после инкубации с модельным субстратом [5]. Активность трансаминаз (АЛТ и АСТ) определяли на автоматическом анализаторе Bayer. Активность церулоплазмينا (ЦП) определяли методом, описанным Камышниковым В.С. [5].

Митохондрии выделяли дифференциальным центрифугированием после гомогенизации ткани в солевом растворе (0,15 М КСl и 10 мМ трис-НСl). Для удаления ядерной фракции гомогенаты центрифугировали 15 мин при 640 г. Фракцию митохондрий выделяли в течение 25 мин при 20 000 г с двукратным промыванием средой выделения. Суспензию митохондрий использовали для определения активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) [9] и цитохромоксидазы (ЦХО) [10].

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программы Statistica 6.0. Статистически достоверными считали отличия, соответствующие оценке ошибки вероятности  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В эритроцитах животных экспериментальной группы (табл. 1) выявлено повышение концентрации 2,3-ДФГ на 101,60%, лактата на 88,40 и уменьшение концентрации ПВК на 35,86% и относительно контрольной группы, что свидетельствует о развитии тканевой гипоксии.

В эритроцитах животных экспериментальной группы установлено увеличение активности СОД на 62,34%, активность каталазы достоверно не изменилась относительно контрольной группы. В условиях неадекватного изменения активности этих ферментов возникает опасность накопления пероксида водорода, обладающего цитотоксическим действием и способностью инициировать перекисное окисление липидов (ПОЛ).

При определении активности ферментов обмена глутатиона в эритроцитах не выявлено статистически значимого изменения активности ГПО. Активность ГР и концентрация GSH были снижены соответственно на 20,92% и 28,59% по сравнению с контрольной группой, что создаёт условия для осмотического лизиса эритроцитов.

В плазме крови выявлена тенденция к повышению активности АЛТ на 19,57% и АСТ на 13,98% по сравнению с контрольной группой. Обращает внимание значительное снижение активности ЦП — на 58,64%. ЦП, являясь белком, синтезируемым исключительно печенью, может выступать в качестве биохимического маркера, отражающего степень нарушения функций гепатоцитов.

В гепатоцитах животных экспериментальной группы также выявлено повышение содержания лактата на 39,72%, уровень ПВК достоверно не изменился по сравнению с контрольной группой (табл. 2).

В гепатоцитах животных экспериментальной группы выявлено повышение активности СДГ на 84,02% и ЦХО на 29,55% относительно контрольной группы. В условиях изменения кислородного обеспечения органов наблюдаются фазные изменения активности ферментных митохондриальных комплексов. В процессе метаболической адаптации к гипоксии активация сукцинатзависимо-

го участка дыхательной цепи позволяет сохранять внутриклеточный баланс АТФ, необходимый для сохранения функциональной активности клетки [11].

В гепатоцитах животных экспериментальной группы выявлено статистически значимое повышение активности гл-6-фДГ на 36,61% по сравнению с контрольной группы. Увеличение скорости начального этапа пентозофосфатного шунта в условиях гипоксии обеспечивает усиление генерации восстановленного кофермента НАДФ, необходимого для детоксикации и восстановительных биосинтезов.

При определении активности антиоксидантных ферментов в гепатоцитах экспериментальных животных вы-

явлено увеличение активности СОД на 86,71% и каталазы на 71,87% по сравнению с контрольной группой (табл. 2). Параллельно установлены неравнозначные изменения ферментов обмена глутатиона: повышение активности ГПО на 34,43% снижение активности ГР на 47,90% и концентрации GSH на 19,77% относительно показателей животных контрольной группы.

Резюмируя представленные данные можно заключить, что общая метаболическая реакция на длительный приём симвастатина у интактных животных характеризуется развитием гипоксии, что подтверждается увеличением концентрации 2,3-ДФГ в эритроцитах, накоплением лактата в эритроцитах и гепатоцитах. Накопле-

Таблица 1

**Концентрация метаболитов гликолиза и активность ферментов углеводного обмена и антиоксидантной защиты в эритроцитах животных экспериментальной группы**

Показатели	Группы	
	Контрольная группа 1, n = 35	Экспериментальная группа, n = 35
2,3-ДФГ, [мкмоль/мл плотного осадка]	8,17 ± 0,850	16,471 ± 0,850 p<0,001
Лактат, [мкмоль/мл плотного осадка]	4,88 ± 0,400	9,19 ± 0,860 p<0,001
ПВК, [мкмоль/мл плотного осадка]	2,20 ± 0,730	1,41 ± 0,22 p>0,05
Гл-6ф-ДГ, [мкмоль/г Hb]	3,026 ± 0,507	2,561 ± 0,180 p>0,05
СОД, [усл. ед./г Hb]	1195 ± 137	1940 ± 189 p<0,001
Каталаза, [мКат/г Hb]	2,598 ± 0,728	2,232 ± 0,386 p>0,05
GSH, [мкмоль/г Hb]	16,916 ± 2,86	12,08 ± 1,911 p<0,05
ГПО, [мкмоль/г Hb]	13,151 ± 3,20	12,066 ± 0,765 p>0,05
ГР, [мкмоль/г Hb]	0,760 ± 0,063	0,601 ± 0,077 p<0,05
АЛТ [мкКат/л]	0,401 ± 0,082	0,495 ± 0,075 p>0,05
АСТ [мкКат/л]	0,565 ± 0,069	0,644 ± 0,090 p>0,05
ЦП	2,026 ± 0,573	0,838 ± 0,091 p<0,001

Примечание. p — достоверность относительно показателей контрольной группы.

Таблица 2

**Содержание метаболитов гликолиза и активность ферментов углеводно-энергетического обмена и антиоксидантной защиты в гепатоцитах животных экспериментальной группы**

Показатели	Группы	
	Контрольная группа, n = 35	Экспериментальная группа, n = 35
ПВК, [мкмоль/мг белка]	1,48 ± 0,353	1,27 ± 0,206 p>0,05
Лактат, [мкмоль/мг белка]	3,10 ± 0,561	4,33 ± 0,482 p<0,05
Гл-6ф-ДГ, [мкмоль/мг белка]	0,224 ± 0,044	0,306 ± 0,048 p<0,05
СДГ, [нмоль/мг белка]	21,80 ± 3,787	40,11 ± 7,044 p<0,02
ЦХО [нмоль/мг белка]	0,044 ± 0,00077	0,057 ± 0,0075 p<0,001
СОД, [усл. ед./мг белка]	17,571 ± 3,489	32,81 ± 5,496 p<0,001
Каталаза, [мКат/мг белка]	22,52 ± 4,028	38,70 ± 6,717 p<0,02
GSH, [мкмоль/г Hb]	1062 ± 80,79	852 ± 98,00 p<0,05
ГПО, [мкмоль/мг белка]	98,38 ± 9,470	132,26 ± 13,481 p<0,05
ГР, [мкмоль/мг белка]	0,428 ± 0,095	0,223 ± 0,042 p<0,05

Примечание. p — достоверность относительно показателей контрольной группы.

ние лактата на фоне снижения концентрации ПВК, выявленное в эритроцитах и гепатоцитах животных экспериментальной группы отражает изменение метаболизма в сторону превалирования анаэробных процессов и создаёт условия для формирования метаболического ацидоза, что, в свою очередь, изменяет активность ферментных систем клетки. Накопление лактата и тенденция к снижению активности гл-6-ф-ДГ в эритроцитах может отражать изменение соотношения скоростей гликолиза и пентозофосфатного шунта в сторону формирования гипергликолиза и привести к несостоятельности адаптивных механизмов.

Гипоксический стимул оказывает мощное воздействие на всю систему транспорта кислорода, инициирует функциональную перестройку структур, принимающих участие в его утилизации в тканях. Энергетический обмен, интенсивность которого находится в тесной взаимосвязи с кислородным обеспечением клетки, вовлекается в процесс как единая функциональная система, в которой важнейшее регуляторное значение имеет изменение активности митохондриальных ферментных комплексов [11]. Повышение активности СДГ и ЦХО в гепатоцитах животных экспериментальной группы направлено на поддержание энергетического баланса клетки, однако, может привести в постепенному «переутомлению» и истощению адаптивных механизмов.

Повреждающее действие гипоксии реализуется за счёт совокупности факторов, обеспечивающих активацию ПОЛ, и требует повышения мощности внутриклеточных защитных механизмов [12]. Характерной чертой изменения активности ферментативных антиоксидантов в исследуемых клетках является значительное увеличение активности СОД и снижение концентрации GSH. По данным литературы, Mn-СОД и ГПО являются основными ферментативными антиоксидантами митохондрий и клеточных мембран, снижают выход цитохрома с из митохондрий и предотвращают развитие апоптоза при действии повреждающих факторов. Снижение концентрации GSH в клетках печени в условиях гипоксии служит индикатором мощности АОЗ и приводит к нарушению их функции [13]. Выявленные нами разнонаправленные изменения активности глутатион-зависимых ферментов, повышение активности ферментов первой линии антиоксидантной защиты свидетельствуют о напряжении защитных механизмов эритроцитов и клеток печени, что может привести к их постепенному истощению.

#### Сведения об авторах:

Микашинович Зоя Ивановна, доктор, биол. наук, проф., зав. каф. общей и клинической биохимии № 1 ГБОУ ВПО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России, e-mail: kbunpk-rostov@yandex.ru

Саркисян Олег Грачинович, канд. мед. наук, доцент каф. общей и клинической биохимии № 1 ГБОУ ВПО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России, e-mail: vergiliusmerlin@yandex.ru

При действии повреждающего фактора адаптивная перестройка клетки должна быть направлена на изменение функциональной активности систем, способных обеспечить сохранение её жизнедеятельности с наименьшими затратами. Биохимические изменения в плазме крови отражают тенденцию к формированию синдрома цитолиза, нарушению биосинтетической функции печени, что может быть метаболическим отражением несостоятельности адаптивных механизмов и развития дизрегуляторной патологии печени.

#### References

1. Dolzhenko M.N., Bazilevich A.Ya., Simagina T.V. et al. Statines safety: pro et contra. *Mistetstvo likuvannya*. 2010; 2(68): 26-34. (in Russian)
2. Kang S., Liu Y., Liu X.B. Effects of aggressive statin therapy on patients with coronary saphenous vein bypass grafts: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. 2013; Vol. 35(8): 1125-36.
3. Maji D., Sh., Solanki et al. Safety of statins. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 2013; 17(4): 636-46.
4. Lukanova I.S., Blinov M.N. Estimation of 2,3-BPG by nonenzymatic method and ATP in erythrocytes of patients with chronic lympholeucosis. *Laboratory business*. 1975; 7: 652-4. (in Russian)
5. Kamyshnikova V.S., ed. Guide on biochemical investigations and laboratory diagnostics. Moscow, «MEDpress-inform»; 2004. (in Russian)
6. Guide on laboratory methods of investigation. Under the editorship of Danilovoy L.A. — St.Petersburg: Piter, 2003:736. (in Russian)
7. Gurevich V.S., Kontorshchikova K.N., Shatilina L.V. Competitive analysis of two methods of superoxidodismutase estimation. *Laboratory business*. 1990; 4: 44-7. (in Russian)
8. Mikashinovich Z.I., Letunovskiy A.V., Volzhin O.O. et al. Biochemical investigations of saliva in clinical practice. Rostov-on-Don, RostGMU Publishers; 2004. (in Russian)
9. Nordmann I.N. Gauchery J. Determination the activiti dehydrogenasiue des mitochondriies a 1-acid-dichloride-2,3,5-triphenyl-tetrazolium. *Bull. Sos. Chim. Biol.* 1957; V. 33: 189-97.
10. Krivchenkova R.S. Estimation of cytochromeoxidase activity in mythochondrial suspension. *Modern methods in biochemistry*. Moscow; Medicine, 1977. (in Russian)
11. Luk'yanova L.D., Dudchenko A.M., Tsybina T.A. et al. Regulatory role of mithochondrial dysfunction in hypoxia and it interrelation with transcriptional activity. *Vestnik Rossiyskoy AMN*. 2007; 2: 3-13. (in Russian)
12. Kryzhanovskiy G.N. Dysregulatory pathology. Moscow: Medicine, 2002. (in Russian)
13. Kulinskiy V.I., Kolesnichenko L.S. Gluthathione I system. Synthesis, transport of gluthathionetransferase, gluthathioneperoxidase. *Biomedicine chemistry*. 2009; 55(3): 255-77. (in Russian)

Поступила 28.10.13



Баев В.М., Кудрявцева Е.Н.

## Адаптация к физической нагрузке и состояние вегетативной нервной системы у молодых женщин с низким артериальным давлением

ГБОУ ВПО ПГМУ им. ак. Е.А.Вагнера Минздрава России (Пермь, Россия), 614990, г.Пермь, ул. Петропавловская, 26

**Цель исследования** — изучение взаимосвязи между адаптацией сердечно-сосудистой системы к физической нагрузке и состоянием вегетативной нервной системы у молодых женщин с НАД. **Методика.** Оценивали тест Руффьера и индекс Кердо у женщин-студентов университета в возрасте 18—35 лет, занимающихся физкультурой в рамках учебного процесса. Сравнивали показатели 69 женщин с НАД (САД 61—99 мм рт. ст.) и 35 женщин с нормальным артериальным давлением (САД 120—129 мм рт. ст.). Индекс Руффьера в группах не различался и в среднем соответствовал «хорошему результату». В группе женщин с НАД выявлено снижение кардиореспираторной выносливости (индекс Руффьера равный 10 и выше) при симпатической активации. Снижение регистрировали в 14,5% (10 случаев), что значимо чаще, чем при парасимпатической активации (0 случаев, при  $p = 0,003$ ). Анализ динамики САД, ДАД и пульса при выполнении теста Руффьера показал, что у лиц с НАД после 1-минутного отдыха САД и ДАД были выше исходного уровня. **Выводы.** По данным теста Руффьера, основанного на оценке пульса, только у молодых женщин с НАД и симпатикотонией в 14,5% случаев имеется недостаточный уровень адаптации к физической нагрузке, тогда как при НАД с ваготонией — лишь хорошая и средняя адаптация к физической нагрузке. Скрининг-тест физической нагрузки у молодых женщин с НАД не учащает пульс, но приводит к незначительно повышению САД и ДАД.

**Ключевые слова:** низкое артериальное давление, адаптация к физической нагрузке, вегетативная нервная система.

**Для цитирования:** Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015; 59(4): 97-100.

Baev V.M., Kudryavtseva E.N.

## Adaptation to physical load and the state of the autonomic nervous system in young women with low blood pressure

Vagner Perm State Medical University, Petropavlovskaya Street, 26, 614990, Perm, Russia

**Objective:** The purpose of research — the study of the relationship between adaptation of the cardiovascular system to physical activity and the autonomic nervous system in young women with low blood pressure. **Methods.** Evaluated test Ruffier index Kerdo women-university students aged 18—35 years, engaged in physical culture within the educational process. Compare the 69 women with low blood pressure (SBP 61—99 mmHg) and 35 women with normal blood pressure (SBP 120—129 mmHg). Index Ruffier groups did not differ in average and adequate «good result». In the group of women with low blood pressure showed a reduction in fitness (Ruffier-index of 10 or higher) when sympathetic activation. Reduced recorded in 14.5% (10 cases), which is significantly more than the parasympathetic activation — 0 cases when  $p = 0.003$ . Analysis of the dynamics of SBP, DBP and heart rate during the Ruffier test showed that low blood pressure after 1 minute rest in SBP and DBP were higher than baseline. **Conclusions.** According to the test Ruffier in young women with low blood pressure and sympathicotonia in 14.5% of cases there is a lack of adaptation to physical stress. When low blood pressure with vagotonia — only good and average adaptation to physical stress. Screening test of physical activity in young women with low blood pressure are not quickens the pulse, but leads to a slight increase in SBP and DBP.

**Keywords:** low blood pressure, fitness, autonomic nervous system.

**For citation:** Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya. 2015; 59(4): 97-100

**For correspondence:** Baev V.M., e-mail: VMBaev@Hotmail.com

Изучение механизмов функционирования организма при патологических состояниях является важной задачей медицины [1]. Однако многие звенья патогенеза низкого артериального давления (НАД), не изучены [2]. До 30% молодых женщин с НАД отмечают у себя сниженную способность к физической работе [3]. У лиц с НАД пульс в 170 уд./мин достигается при меньшей мощности физической нагрузки, что, по мнению авторов, требует исследования состояния тонуса и реактивности вегетативной нервной системы [4]. Нам представляется эта проблема очень важной, учитывая преобладание симпатического звена автономной нервной системы (АНС) при НАД [5].

*Цель исследования* — изучение взаимосвязи между адаптацией сердечно-сосудистой системы к физической нагрузке и состоянием вегетативной нервной системы у молодых женщин с низким артериальным давлением.

### Методика

Группы исследования — студентки с нормальным артериальным давлением (АД) и НАД. Изучали параметры сердечно-сосудистой системы в покое и после физической нагрузки (с расчетом индекса Руффьера), а также баланс между симпатической и парасимпатической нервной системой в покое (по индексу Кердо). Критерии включения: женский пол, возраст от 18 до 35 лет. Критерии исключения: наличие признаков дисплазии соединительной ткани, наркомания, онкологические заболевания, анемии, сахарный диабет, гипотиреоз, надпочечниковая недостаточность, коллагенозы, врожденные заболевания сердца и сосудов, оперированное сердце, острая респираторно-вирусная инфекция, беременность. Тип исследования — одномоментный. Обследование проводилось при осмотре студентов Пермских ВУЗов перед допуском к спортивным занятиям. Место обследования — медицинская амбулатория. Время осмотра — с 15 до 19 ч. Систолическое артериальное давление (САД) в диапазоне 120—129 мм рт. ст. определяли как нормальное [6]. САД в диапазоне 61—99 мм рт. ст. расценивали как низкое [5, 7, 8]. САД, диастолическое артериальное давление (ДАД) и пульс рассчитывали по средней величине после двукратного измерения тонометром A&D UA-777 (AGD Company Ltd., Япония, 2012) на правом плече в положении сидя и предплечье на столе.

Оценку реакции сердечно-сосудистой системы на физическую нагрузку проводили по пульсу с помощью теста Руффьера, результатом которого был расчет индекса Руффьера (ИР) по формуле:  $ИР = [(P_0 + P_1 + P_2) - 200] / 10$ , где  $P_0$  — ис-

ходный пульс до физической нагрузки (после 5-минутного отдыха в положении сидя),  $P_1$  — пульс в положении стоя после физической нагрузки (20 приседаний за 30 секунд),  $P_2$  — пульс в положении сидя и 1 мин отдыха после физической нагрузки [9, 10]. ИР классифицировали следующим образом: от 0 до 5 баллов — хорошая адаптация к физической нагрузке; от 5- до 10 баллов — средний уровень адаптации к физической нагрузке; от 10 до 15 баллов — недостаточная адаптация к физической нагрузке; выше 15 баллов — несоответствие адаптации физической нагрузке [10, 11].

САД и ДАД измеряли в те же периоды времени, что и частоту пульса в тесте Руффьера. Преобладание симпатического или парасимпатического отдела АНС в состоянии покоя определяли по вегетативному индексу (ВИ) Kerdo I.:  $ВИ = (1 - d/\rho) * 100$ , где  $d$  — ДАД,  $\rho$  — пульс [12]. Положительные значения ВИ включали нулевые значения, трактовали как преобладание симпатического отдела АНС, отрицательные — как парасимпатического. Протокол проведения исследования на добровольцах соответствовал пересмотренному варианту Хельсинкской декларации 1975 г. (59 WMA Ассамблея, Сеул, 2008). План и дизайн исследования одобрен этическим комитетом академии (протокол № 74). Лица, допущенные к обследованию, дали письменное согласие на участие в настоящем исследовании.

Статистический анализ проводили с помощью программы «Statistica 6.1» (серийный номер AXXR912E53722FA, StatSoft-Russia, 2009). В описательной статистике использовали медиану, 25-й процентиль и 75-й процентиль, так как изучаемые данные не имели признаков нормального распределения. Для сравнения количественных данных двух независимых групп использовали непараметрический критерий Манна—Уитни. Динамику параметров в процессе выполнения пробы Руффьера оценивали по критерию Frank Wilcoxon. По критерию  $\chi^2$  сравнивали различие в частоте встречаемости признаков в группах [13].

### Результаты и обсуждение

Обследовано 69 женщин с низким САД (группа № 1) и 35 женщин с нормальным САД (группа № 2). Возраст женщин в группах был одинаковым: медиана — 19 лет (25-й процентиль — 18 лет; 75-й процентиль — 20 лет),  $p = 0,46$ .

ИР в группах не различался и соответствовал «средней адаптации» к физическим нагрузкам: группе № 1 медиана ИР составила 6 баллов (25-й процентиль — 4 балла; 75-й процентиль — 8 баллов), в группе № 2 — 7 баллов (25-й процентиль —

5 баллов; 75-й процентиль — 9 баллов),  $\rho = 0,06$ . В группе № 1 «хорошую адаптацию» зарегистрировали у 29 чел. (42%), в группе № 2 — у 8 чел. (23%;  $\rho = 0,09$ ). Недостаточная адаптация в группе № 1 выявлена у 10 чел. (14,5%), в группе № 2 — у 5 чел. (17%;  $\rho = 0,69$ ). «Несоответствие адаптации» в группах не выявлено.

ВИ в группах различался: группе № 1 медиана ВИ составила 13 (25-й процентиль — 5; 75-й процентиль — 20), в группе № 2 — 1 (25-й процентиль равен — 5; 75-й процентиль равен 15),  $\rho = 0,001$ . Соответственно, выявлены различия в преобладании симпатического отдела АНС. В группе № 1 симпатикотонию зарегистрировали у 61 чел. (88%), в группе № 2 — у 20 чел. (57%;  $\rho = 0,000$ ).

Было проведено сравнение исходного и конечного САД, ДАД и пульса при выполнении физической нагрузки в тесте Руффьера (табл. 1).

Обнаружено, что выполнение теста Руффьера приводит к повышению САД (в среднем на 7 мм рт. ст.) и ДАД (в среднем на 2 мм рт. ст.) у молодых женщин с НАД, тогда как при нормальном артериальном давлении САД снижается (в среднем на 5 мм рт. ст.), ДАД не изменяется. Динамики пульса после скрининг-теста физической нагрузки в обеих группах не выявлено.

В группе № 1 при симпатикотонии наблюдался более высокий балл ИР, чем при ваготонии (табл. 2). В группе № 2 такой закономерности не выявлено. Соответственно, в группе № 1 недостаточная адапта-

ция к физической нагрузке была только при симпатикотонии (10 случаев или 14,5%), в этой же группе при ваготонии зарегистрировано только хороший и средний уровень адаптации, недостаточной адаптации не было, при  $\rho = 0,003$ .

Известно, что у лиц с нормальным артериальным давлением после физической нагрузки регистрируется снижение АД (как оптимальная реакция сердечно-сосудистой системы) [14]. В нашем исследовании выявлено, что у женщин с НАД после физической нагрузки САД и ДАД незначительно повышаются.

По данным литературы, у молодых людей 16—17 лет преобладающей является исходная ваготония [16]. Причем подростки с исходной ваготонией демонстрируют более высокие показатели физической работоспособности, а также толерантности мышц к статическим нагрузкам субмаксимальной интенсивности, чем подростки с симпатикотонией. С другой стороны, при патологии системы кровообращения, например, у молодых пациентов с дисплазией соединительной ткани, сочетающейся с аритмическим синдромом, преобладает симпатикотония [17]. Уже во многих исследованиях доказана прогностически неблагоприятная роль преобладания симпатического тонууса в развитии сердечно-сосудистых заболеваний (в форме нарушения ритма и внезапной смерти).

Предполагаем, что наличие жалоб на плохую переносимость физической нагрузки у молодых женщин с НАД может быть связано с ухудшением вегетативных и нейропсихологических функций, повышенной

Сравнение САД, ДАД, пульса при выполнении теста Руффьера в группах № 1 и № 2 (с использованием критерия Frank Wilcoxon)

Таблица 1

Группы обследования	Исследуемые параметры	В покое	Через 1 мин после теста	P
Группа № 1, n = 69	САД, мм рт. ст.	98 (96—99)	105 (97—109)	0,000
	ДАД, мм рт. ст.	65 (60—70)	67 (62—71)	0,004
	ЧСС, уд./мин	74 (70—81)	76 (68—82)	0,50
Группа № 2, n = 35	САД, мм рт. ст.	123 (121—126)	118 (110—122)	0,000
	ДАД, мм рт. ст.	74 (69—80)	76 (70—81)	0,51
	ЧСС, уд./мин	76 (72—83)	76 (70—84)	0,85

Сравнение ИР у ваготоников и симпатикотоников в группах № 1 и № 2 (с использованием критерия Манна—Уитни)

Таблица 2

Исследуемые параметры	ВИ менее 0	ВИ равен 0 и более	P
Индекс Руффьера (баллы) в группе № 1 (n = 69)	Медиана — 3 (25-й процентиль — 1; 75-й процентиль — 5); n = 8	Медиана — 6 (25-й процентиль — 4; 75-й процентиль — 8); n = 61	0,014
Индекс Руффьера (баллы) в группе № 2 (n = 35)	Медиана — 7 (25-й процентиль — 3; 75-й процентиль — 7); n = 15	Медиана — 7 (25-й процентиль — 6; 75-й процентиль — 9); n = 20	0,09

чувствительностью к собственным ощущениям [3, 5]. Ведь известно, что факторами риска НАД являются не только женский пол, конституция и генетическая предрасположенность, но и нервно-психические стрессы, низкая двигательная активность [4, 15].

Таким образом, у молодых женщин с НАД преобладает симпатический отдел АНС. По данным теста, основанного на оценке пульса, у молодых женщин с НАД и симпатикотонией в 14,5% случаев имеется недостаточная адаптация к физическим нагрузкам, тогда как при НАД с ваготонией недостаточный уровень адаптации к физической нагрузке не встречается. Скрининг-тест физической нагрузки у молодых женщин с НАД не учащает пульс, но приводит к незначительному повышению САД и ДАД.

### References

1. Moroz V.B. *Actual problems of pathophysiology [Aktual'nye problemy patofiziologii]* Selected lectures. Moscow; Meditsina; 2001. (in Russian)
2. Calkins H., Zipes D.P. Hypotension and syncope. In: Bonow R.O., Mann D.L., Zipes D.P., Libby P., eds. *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 9th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2011; chap 42: 885-96.
3. Baev V.M., Koryukina I.P., Kudryavtseva E.N., Kolyrina E.N., Golubina I.N., Danshina A.S. et al. Low Blood Pressure in Young Women: Poor Concentration, Apathy acute Morning Weakness and Dyspeptic Symptoms. *Middle-East Journal of Scientific Research*. 2013; 14 (4): 476 — 79.
4. Kalgin V.V. *Hypotension in Adolescents, Health Evaluation Criteria*. Diss. Author's Abstract of PhD Thesis. Arkhangel'sk. 2005. 18 p. (in Russian)
5. Baev V.M., Koryukina I.P., Kudryavtseva E.N., Kolyrina E.N., Kozlov D.B. Self-Rating of Mental Status and Depression; Autonomic Nervous System Disbalance in Young Women with Low Blood Pressure. *World Journal of Medical Sciences*. 2013; 8 (4): 382 — 86.
6. Mancia G., De Backer G., Dominiczak A., Cifkova R., Fagard R, Germano G. et al. Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*. 2007; 28: 1462 — 536.
7. Baev V.M., Koryukina I.P., Kudryavtseva E.N., Gulyaeva I.L., Kozlov D.B. High Mean Blood Flow Velocity and the Level of Peripheral Resistance in the Common Carotid Artery in Young Women with Low Blood Pressure. *World Applied Sciences Journal*. 2014; 30 (2): 199 — 02.
8. Miwa K., Fujita M. Cardiovascular Dysfunction with Low Cardiac Output Due to a Small Heart in Patients with Chronic Fatigue Syndrome. *Internal Medicine*. 2009; 48: 1849 — 54.
9. Jousselein E. Le test de Ruffier — Improprement appele «test de Ruffier-Dickson». *Medecins du sport*. 2007; 83; 33 — 4.
10. Ruffier J.E. Considerations sur l'indice de resistance du coeur a l'effort. *Med Educ Phys Sport*. 1951; 3: 7- 12.
11. Engel J.C. Etude critique et methodologique de l'indice cardiaque de Ruffier. *MemoIPE pour le CES de medecine du sport*. Paris 5: Cochin. 1977.
12. Kerdo I. Ein aus Daten der Blutzirkulation kalkulierter Index zur Beurteilung der vegetativen Tonuslage. *Acta neurovegetativa*. 1966; 29 (2): 250 — 68.
13. Glantz S.A. *Sample of Biostatistics*. McGraw-Hill, Inc. 1994.
14. . Exercise characteristics and the blood pressure response to dynamic physical training. *Med Sci Sports Exerc*. 2001; 33 (6): 484 — 92.
15. Ciaroni S. Do we have to be scared of chronic constitutional low blood pressure. *Revue medicale Suisse*. 2011; 7 (285): 544 — 47.
16. Nezhkina N.N., Kuligin O.V. Characteristics of physical development and physical fitness of students 16-17 years depending on the type of initial vegetative tone. *Lechebnaya fizkul'tura i sportivnaya meditsina*. 2011; 5: 25 — 30. (in Russian)
17. Moskvina Ju.V., Nechaeva G.I. Adrenoreactivity in patients with arrhythmic syndrome associated with vascular tissue dysplasia, in patients receiving magnesium orotate. *Kardiologiya*. 2011; 3: 54 — 7. (in Russian)

Поступила 20.07.13

### Сведения об авторах:

Кудрявцева Елена Николаевна (Kudryavtseva Elena Nikolaevna), аспирант. Кафедра скорой медицинской помощи ДПО.

Решетняк В.К., Кукушкин М.Л., Гурко Н.С.

## Патогенетические механизмы фантомно-болевого синдрома

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

В обзоре рассматриваются данные литературы об эпидемиологии фантомно-болевого синдрома (ФБС) излагаются результаты многочисленных клинических исследований свидетельствующих о недостаточной эффективности подавляющего большинства современных немедикаментозных и фармакологических методов лечения ФБС. Подробно представлены современные данные о патогенетических механизмах, лежащих в основе ФБС. По мнению большинства исследователей, ведущее значение в патогенезе ФБС имеет реорганизация соматосенсорной области коры больших полушарий мозга. Одновременно рассматриваются взгляды исследователей считающих, что основной причиной ФБС является усиление ноцицептивной и неноцицептивной афферентации в периферической нервной системе. В результате сопоставления этих противоречивых данных делается вывод о том, что в генезе ФБС играет роль как первичная, так и вторичная сенситизация. Ведущее значение имеет дисфункция центральной нервной системы. Подробно излагаются современные представления о механизмах, лежащих в основе высокой эффективности подавления ФБС при стимуляции моторной коры головного мозга.

**Ключевые слова:** фантомно-болевого синдром, ноцицептивная афферентация, реорганизация коры головного мозга, стимуляция моторной области коры головного мозга.

**Для цитирования:** Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015; 59(4): 101-107.

Reshetnyak V.K., Kukushkin M.L., Gurko N.C.

## Pathogenetic mechanisms of phantom-pain syndrome

«Scientific research Institute of General pathology and pathophysiology» Baltiyskaya St., 8, Moscow, 125315, Russia

This review considers the literature data on the epidemiology of phantom-pain syndrome (PPS) presents the results of numerous clinical studies demonstrating the lack of effectiveness of the vast majority of modern non-pharmacological and pharmacological methods of treatment of PPS. Detail presents data on the pathogenetic mechanisms underlying the PPS. According to most researchers, the major role in the pathogenesis of the PPS has the reorganization of the somatosensory area of the cerebral cortex of the brain. At the same time discusses the views of researchers who believe that the main reason PPS is to strengthen nociceptive and nonnociceptive afferentation in the peripheral nervous system. The comparison of these conflicting data it is concluded that in the genesis of the PPS plays the role of both primary and secondary sensitization. Leading important dysfunction of the central nervous system. Details the modern understanding of the mechanisms underlying the high efficiency of suppression of PPS during stimulation of motor cortex.

**Keywords:** phantom-pain syndrome, nociceptive afferentation, reorganization of the cerebral cortex, stimulation of the motor cortex of the brain

**For citation:** Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya. 2015; 59(4): 101-107

**For correspondence:** Reshetnyak V.K., e-mail: VKR46@yandex.ru

Фантомно-болевого синдром (ФБС) занимает одно из ведущих мест среди нейрогенных болевых синдромов и является наиболее тяжелым осложнением ампутации конечностей. Фантомная боль — интенсивное, очень разнообразное болевое ощущение, по сути своей является патологической болью, утратившей свою сигнальную функцию и приобретшей характер длительной или постоянной болезни [1].

Распространенность ФБС достаточно велика. В связи с тенденцией увеличения техногенного трав-

матизма и заболеваний диабетом, в мире ежегодно производится около миллиона ампутаций конечностей. Только в США ежегодно производится 135 тысяч ампутаций. По данным американских [2] и английских [3] исследователей, частота возникновения фантомной боли у ампутантов достигает 80%. По данным других авторов, частота возникновения ФБС может достигать 85% [4].

Несмотря на большое количество исследований до настоящего времени остаются недостаточно понятны-

ми патогенетические механизмы ФБС [5]. Трудности понимания патогенетических механизмов ФБС обусловлены тем, что в его основе лежат множественные механизмы [6]. Предполагается, что этот синдром может быть результатом «врожденного ощущения» конечности, несмотря на её отсутствие [7, 8]. Другие авторы предполагают, что фантомно-болевым синдромом может возникать в результате наличия проприоцептивной памяти [9] или болевой памяти [10—12]. Некоторые исследователи считают, что болевой синдром возникает вследствие изменения афферентного потока после повреждения нервов ампутированной конечности [13—15]. Предполагается также, что в основе фантомно-болевого синдрома лежат нейропластические изменения, приводящие к длительной гиперактивации нейронов центральной нервной системы [16, 17].

В настоящее время начинает доминировать мнение, что ФБС прямо связан с дезадаптационной пластической реорганизацией коры больших полушарий [6, 18]. В частности, достаточно давно показано целым рядом исследований, что после ампутации верхней конечности отмечается уменьшение коркового представительства соответствующей конечности в первой соматосенсорной и моторной областях и увеличение соседних участков представительства рта и лица в этих областях коры [19—21]. О ведущем значении коры головного мозга в генезе ФБС свидетельствует ряд фактов. Например, ампутация конечности или соответствующее повреждение нерва ведет к изменению соматотопического представительства в первичной соматосенсорной коре (SI) [22—26]. Некоторые авторы даже считают, что интенсивность ФБС коррелирует со степенью функциональной реорганизации соматосенсорной коры [27].

Корковая реорганизация сопровождается усилением возбудимости кортикальных нейронов и снижением активности корковых тормозных ГАМКергических интернейронов [28—31]. В клинических исследованиях у пациентов с развившимся и неразвившимся после ампутации ФБС методом регистрации соматосенсорных вызванных потенциалов (ССВП) было установлено, что у пациентов страдающих ФБС в полушарии контралатеральном ампутированной конечности, регистрируется увеличение амплитуды ранних компонентов ССВП, наличие гиперсинхронных постразрядов и пароксизмальной активности, проявляющейся в виде острых волн на кортикограмме, что свидетельствует о повышении возбудимости и реактивности структур соматосенсорной системы. У пациентов с неразвившимся болевым синдромом подобные изменения биоэлектрической активности не наблюдались [32].

Реорганизация сенсомоторной коры наблюдается также при повреждении спинного мозга [33] и при комплексном региональном болевом синдроме [34], что дает возможность предполагать общность механизмов лежащих в основе невропатической боли, ассоциирующейся с анатомическими и функциональными нарушениями соматосенсорной системы [35].

Кроме соматосенсорной и моторной коры пластические изменения после ампутации могут также происходить в задней париетальной области коры мозга, которая ответственна за восприятие схемы тела и боли [36—38]. В этой области коры отмечается абнормальное увеличение кровотока у людей с ампутированными конечностями [39]. Другими авторами также было показано, что в участках коркового представительства ампутированных конечностей отмечается усиление нейрональной активности, сопровождаемой увеличением фокальной гиперперфузией [40, 41].

У большинства пациентов фантомная боль имеет среднюю или очень сильную интенсивность. Тем не менее, очень немногие из пациентов используют медикаменты для лечения боли [42—43].

Это объясняется неэффективностью лечения ФБС как в конце прошлого века [44], так и до настоящего времени [42, 45]. Всего насчитывается около 70 медикаментозных и немедикаментозных методов лечения фантомной боли.

К немедикаментозным методам лечения можно отнести акупунктуру [46], чрезкожную электростимуляцию нервов [47, 48], стимуляцию спинного мозга [49], стимуляцию подкорковых структур мозга [50], транскраниальную магнитостимуляцию моторной области коры мозга [51]. Для лечения фантомно-болевого синдрома используется также метод импульсного радиочастотного воздействия на соответствующие дорзальные ганглии с целью их частичной деструкции [52] и даже такая, патофизиологически необоснованная, нейрохирургическая операция, как таламотомия [53]. В пилотном исследовании у двух пациентов положительный эффект был получен при использовании электроконвульсивной терапии [54].

Немедикаментозное лечение проводится также с использованием различных психофизиологических методов: биологической обратной связи, зеркальной терапии [55].

Применяется целый ряд фармакологических препаратов: морфин и мексилитин [56], габапентин [57], амитриптилин [58], кальцитонин [59], кетамин [17], мемантин [60] тиназидин [61], феназепам, сиднокарб [62] и другие современные фармакологические препараты. При проведении лечения ФБС для повышения его эффективности необходимо осуществлять дифференцированный подход и комплексную фармакотерапию [63].

Некоторые авторы считают, что недостаточная эффективность применяемых немедикаментозных и фармакологических методов лечения обусловлена тем, что не учитываются пластические изменения, лежащие в основе патогенетических механизмов ФБС [18].

Если дезадаптивная реорганизация ЦНС обуславливает возникновение ФБС, то эффективным методом лечения может быть устранение этой реорганизации [6]. Одним из таких методов является транскраниальная стимуляция постоянным током — возбуждающая (стимуляция анодом) и тормозящая (стимуляция катодом) спонтанную нейрональную активность. Такая стимуляция вызывает деполяризацию или гиперполяризацию нейронов. Этот метод воздействия основан на длительной потенциации или депрессии синаптической передачи влияющей на нейропластичность [64, 65]. В настоящее время продолжает увеличиваться объем данных свидетельствующих об эффективности анодальной стимуляции моторной коры для лечения различных хронических невропатических болевых синдромов [66], ассоциируемых с дезадаптивными пластическими изменениями в центральной и периферической нервной системе [67—70]. Регуляция возбудимости моторной коры анодальной стимуляцией может модулировать восприятие боли посредством непрямого действия на модулирующие боль структуры, такие как таламус [66, 71, 72]. Предполагается, что активация таламических ядер влияет на несколько структур связанных с восприятием боли, в частности, на переднюю цингулярную кору, периаквадуктальное серое вещество и спинной мозг. Эти структуры влияют на прохождение афферентного ноцицептивного потока и на аффективно-эмоциональное восприятие боли [35, 66, 72]. Кроме того, постоянная стимуляция моторной коры посредством вживленных электродов или периодическая транскраниальная стимуляция активирует эндогенную опиоидную систему, что также способствует достижению анальгетического эффекта [73, 74]. Помимо этого, стимуляция моторной коры приводит к восстановлению внутрикорковых тормозных процессов, которые нарушаются при ампутации [75, 76].

Нормализация тормозных процессов в самой моторной коре тоже может частично влиять на возникновение анальгетического эффекта при ее стимуляции [18]. Это предположение согласуется с данными о том, что ГАМКергические синаптические связи усиливают анальгетический эффект стимуляции моторной коры при невропатической боли [77]. Как известно ГАМКергические синаптические связи имеют большое значение в патогенезе различных болевых синдромов [78].

Недавно был проведен сравнительный анализ эффективности стимуляции зоны М1 моторной коры и париетальной коры при ФБС, при культевой боли, при неболевом фантоме и при фантомном ощущении телескопической конечности. Длительность стимуляции составляла несколько минут. Анодная стимуляция зоны М1 вызывала короткий анальгетический эффект (90 мин) только для фантомной боли. Катодная стимуляция париетальной коры давала короткий эффект только для исчезновения неболевого фантома. Культевая боль или ощущение телескопической конечности не исчезали как при стимуляции зоны М1, так и при стимуляции париетальной коры [18].

Тот факт, что стимуляция моторной коры подавляет фантомную боль, и не влияет на боль в культе, свидетельствует о различных механизмах этих двух видов боли. Предполагается, что анодная стимуляция деафферентированной моторной коры приводит к реактивации латентного представительства утраченной конечности и это способствует снижению фантомной боли [79]. Такое предположение согласуется с клиническими наблюдениями свидетельствующими, что увеличение способности двигать фантомной конечностью может снижать боль, а у ампутантов со сниженной способностью двигать фантомной конечностью боль сильнее [79,80]. Показано также, что иллюзорные движения парализованной конечностью способствуют восстановлению активности моторной коры [81].

Ряд авторов считает, что реактивация представительства утраченной конечности в моторной коре, т.е. восстановление рабочей схемы тела, приводит к подавлению фантомной боли [18,82]. Для этого используются такие методы лечения как тренировка двигательного образа (motor imagery training) и зеркальный ящик (mirror box therapy).

Тот факт, что катодная стимуляция париетальной коры вызывает подавление фантомного не болевого ощущения свидетельствует о том, что не болевое фантомное ощущение связано с подавлением дисфункциональной гиперактивности париетальной коры [83]. Таким образом, большое количество авторов придерживается мнения, что фантомная боль возникает в результате дизрегуляции активности в сенсомоторном матриксе и анодная стимуляция моторной коры снижает или подавляет фантомную боль за счет реактивации представительства утраченной конечности в этой области коры.

Однако существует и другое мнение. Ряд авторов, и в частности, М. Девор, считают, что ведущее значение в генерации ФБС имеет гиперактивность периферической нервной системы [84]. Тот факт, что надавливание на культю провоцирует ФБС (симптом Тинеля) и тот факт, что неврома генерирует спонтан-

ную активность, свидетельствует, что культя может служить источником возникновения боли. В частности, при микроэлектродной регистрации в невrome у ампутантов была зарегистрирована спонтанная повышенная биоэлектрическая активность [13].

В дальнейшем было установлено, что в болевой невrome отмечается увеличение количества изоформ натриевых каналов и повышенная активность протеинкиназы, что частично объясняет повышение активности нервных волокон т.е. их сенситизацию [85]. Однако ФБС часто отмечается и при инфильтрационной блокаде местными анестетиками спонтанной активности в невrome [19, 86]. Поэтому большинство исследователей отказались от гипотезы о том, что ФБС возникает в результате повышенной активности периферической нервной системы и в качестве основного патогенетического механизма ФБС рассматривают нейропластические корковые преобразования, возникающие в результате утраты афферентного входа от ампутированной конечности [6, 9, 87—90].

Однако вторичные источники повышенной нейрональной активности в периферической нервной системе, находящиеся вне культи конечности внимательно не анализировались. Вместе с тем в экспериментах на крысах, кроликах и кошках достаточно давно получены прямые электрофизиологические доказательства наличия спонтанной активности в дорзальных ганглиях спинного мозга [91—93]. Сравнительный анализ свидетельствует, что мощность спонтанной активности генерируемой в дорзальных ганглиях больше чем мощность спонтанных разрядов возникающих в невrome [94, 95]. Микроэлектродные исследования у ампутантов показали, что местная анестезия невromы в культе конечности подавляет сиптом Тинеля, но не подавляет импульсную активность в нерве [13]. Эта активность генерируется в дорзальных ганглиях спинного мозга, так как инфильтрация анестетиком невromы вызывает дистальный блок и не влияет на активность нейронов в вышележащих спинномозговых ганглиях [84]. Спинальная анестезия приводит к блокаде спонтанной активности, как в невrome, так и дорзальных ганглиях. Спинальный блок постоянно снижает и часто полностью подавляет как фантомную боль, так и не болевое ощущение утраченной нижней конечности. Эффект отмечается в течение нескольких часов как у пациентов с недавно, так и давно ампутированными нижними конечностями. Эффект не зависел также от наличия или отсутствия феномена телескопа. Эти данные свидетельствуют о том, что активность, генерируемая в периферической нервной системе, является важнейшим элементом для формирования ощущений, несмотря на то, что осознанное восприятие боли, несомненно, является функцией ЦНС.

Из всех вышеперечисленных результатов исследований становится очевидным, что ФБС является сложным гетерогенным хроническим болевым синдромом и его патогенетические механизмы включают в себя патологические изменения, как в периферической, так и центральной нервной системе. Можно полагать, что в основе ФБС лежит как первичная, так и вторичная сенситизация и доминирующее значение имеет дисфункция ЦНС. Необходимы дальнейшие исследования для более четкого понимания патогенеза ФБС, что необходимо для разработки эффективных методов его лечения.

## References

1. Kukushkin M.L., Reshetniak V.K. Chronic pain syndrome or pain as an independent form of the disease. *Patogenes.* 2003; 1: 34 — 42. (in Russian)
2. Ephraim P., Wegener S., MacKenzie E. et al. Phantom pain, residual limb pain, and back pain in amputees: Results of a national survey. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 2005; 86: 1910-9.
3. Houghton A.D., Nicholls G., Houghton A.L. et al. Phantom pain: natural history and association with rehabilitation. *Ann. R. Coll. Surg Engl.* 1994; 76: 22 — 5.
4. Sherman R.A., Sherman C.J. Prevalence and characteristics of chronic phantom limb pain among American veterans. Results of a trial survey. *Am. J. Phys. Med.* 1983; 62: 227 — 238.
5. Griffin S.C., Tsao J.W. A mechanism-based classification of phantom limb pain. *Pain.* 2014; 155: 2236 — 42.
6. Flor H., Nicolajsen L., Jensen S.T. Phantom limb pain: A case of maladaptive CNS plasticity? *Nat. Rev. Neurosci.* 2006; 7: 873 — 81.
7. Melsack R., Israel R., Lacroix R., Schultz G. Phantom limbs in people with congenital limb deficiency or amputation in early childhood. *Brain.* 1997; 120: 1603 — 20.
8. Brugger P., Kollias S.S., Muri R.M. Beyond re-membering: Phantom sensations of congenitally absent limbs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009; 97: 6167 — 72.
9. Anderson-Barnes V.C., McAuliffe C., Swandberg K.M., Tsao J.W. Phantom limb pain — phenomenon of proprioceptive memory? *Med. Hypotheses.* 2009; 73: 555 — 8.
10. Kats J., Melzack R. Pain «memories» in phantom limbs: Review and clinical observations. *Pain.* 1990; 43: 319 — 36.
11. Ovechkin A.M., Kukushkin M.L., Gnezdilov A.V., Reshetniak V.K. Adequacy periamputating analgesia as a deterrent to the inclusion of a pain memory in the genesis of phantom-pain syndrome. *Anesteziologiya i reanimatologiya.* 1995; 2: 56-9. (in Russian)
12. Ovechkin A.M., Reshetniak V.K. The use of continuous epidural analgesia for the prevention of surgical stress response and postoperative pain syndromes. *Rossiyskiy zhurnal boli.* 2003; 1: 61 — 5. (in Russian)
13. Nystrom B., Hagbarth K.E. Microelectrode recordings from transected nerves in amputees with phantom limb pain. *Neurosci. Lett.* 1981; 27: 211 — 6.
14. Kryzhanovsky G.N., Reshetniak V.K., Kukushkin M.L., Horizontova M.P., Smirnova V.S. Pain syndrome in rats after injury to the sciatic nerve. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya.* 1991; 6: 8 - 10. (in Russian)



15. Kryzhanovsky G.N., Reshetniak V.K., Kukushkin M.L., Smirnova V.S., Zinkevich V.A. The electrical activity in the dorsal horns of the spinal cord and the somatosensory cortex in rats with developed and undeveloped pain after transection of the sciatic nerve. *Bulleten experimentalnoy biologii i meditsiny*. 1993; 115(5): 461 — 3. (in Russian)
16. Kryzhanovsky, G.N., Reshetniak, V.K., Kukushkin M.L., Igonkina S.I., Grafova V.N., Smirnova V.S. Pathological integration in the system of pain sensitivity in the central pain syndrome. *Rossiyskiy zhurnal boli*. 2004; 4: 10 — 5. (in Russian)
17. Eichenberger U., Neff F., Sveticic G., Curatolo M. Chronic phantom limb pain: The effects of calcitonin, ketamin, and their combination on pain and sensory thresholds. *Anesth. Analg.* 2008; 106: 1265 — 73.
18. Bolognini N., Olgiati E., Maravita A., Ferraro F., Fregni F. Motor and parietal cortex stimulation for phantom limb pain and sensations. *Pain*. 2013; 154: 1274 — 80.
19. Birbaumer N., Lutzenberger W., Montoya P., Flor H. Effects of regional anesthesia on phantom limb pain are mirrored in changes in cortical reorganization. *J. Neurosci.* 1997; 17: 5503 — 8.
20. Flor H., Elbert T., Knecht S., Taub E. Phantom-limb pain as perceptual correlate of cortical reorganization following arm amputation. *Nature*. 1995; 375: 482 — 4.
21. Lotze M., Flor H., Birbaumer N. Phantom movements and pain. An fMRI study in upper limb amputees. *Brain*. 2001; 124: 2268 — 77.
22. Devor M., Wall P.D. Reorganisation of the spinal cord sensory map after peripheral nerve injury. *Nature*. 1978; 276: 76.
23. Florence S.L., Hackett T.A., Strata F. Thalamic and cortical contributions to neural plasticity after limb amputation. *J. Neurophysiol.* 2000; 83: 3154 — 9.
24. Florence S.L., Kaas J.H. Large-scale reorganization at multiple levels of the somatosensory pathway follows therapeutic amputation of the hand in monkeys. *J. Neurosci.* 1995; 15: 8083 — 95.
25. Jones E.G. Cortical and subcortical contributions to activity-dependent plasticity in primary somatosensory cortex. *Annu. Rev. Neurosci.* 2000; 23: 1 — 37.
26. Yang T.T., Gallen C.C., Bloom F.E. Noninvasive detection of cerebral plasticity in adult human somatosensory cortex. *Neuroreport*. 1994; 5: 701 — 4.
27. Flor H., Elbert T., Larbig W., Taub E. Phantom-limb pain as a perceptual correlate of cortical reorganization following arm amputation. *Nature*. 1995; 375: 482 — 4.
28. Chen R., Corwell B., Hallett M., Cohen L.G. Mechanisms of cortical reorganization in lower-limb amputees. *J. Neurosci.* 1998; 18: 3442 — 50.
29. Cohen L.G., Bandinelli, Findley T.W., Hallett M. Motor reorganization after upper limb amputation in man: a study with focal magnetic stimulation. *Brain*. 1991; 114: 615 — 27.
30. Ridding M.C., Rothwell J.C. Reorganization in human motor cortex. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1995; 73: 218 — 22.
31. Karl A., Birbaumer N., Cohen L.G., Flor H. Reorganization of motor and somatosensory cortex in upper extremity amputees with phantom limb pain. *J. Neurosci.* 2001; 21: 3609 — 18.
32. Reshetniak V.K., Kukushkin M.L., Ovechkin A.M., Smirnova V.S., Gnezdilov A.V. Peculiarities of changes of somatosensory evoked potentials in patients with amputated limbs in the presence or absence of phantom-pain syndrome. *Anesthesiologiya i reanimatologiya*. 1996; 4: 4 — 7. (in Russian)
33. Wrigley P.J., Press S.R., Gustin S.M., Siddall P.J. Neuropathic pain and primary somatosensory cortex reorganization following spinal cord injury. *Pain*. 2009; 141: 52 — 9.
34. Maihofner C., Baron R., DeCol R., Schattschneider J. The motor system shows adaptive changes in complex regional pain syndrome. *Brain*. 2007; 130: 2671 — 87.
35. Reshetniak V.K., Kukushkin M.L., Gurko N.S. The importance of cortical-subcortical structures of the brain in the perception of acute and chronic pain. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2014; 4: 96-110. (in Russian)
36. Melzack R.,Coderre T.J., Kats J., Vaccarino A.L. Central neuroplasticity and pathological pain. *Ann. NY Acad. Sci.* 2001; 933: 157 — 74.
37. Moisser X., Bouhassira D. Brain imaging of neuropathic pain. *Neuroimage*. 2007; 37:S80-88.
38. Porro C.A., Martinig M., Fadiga L. Parietal cortex involvement in the localization of tactile and noxious mechanical stimuli: a transcranial magnetic stimulation study. *Behav. Brain. Res.* 2007; 178: 183 — 9.
39. Kew J.J., Ridding M.C., Brooks D.J. Reorganization of cortical blood flow and transcranial magnetic stimulation maps in human subjects after upper limb amputation. *J. Neurophysiol.* 1994; 72: 2517 — 24.
40. Hung G.U., Tan T.S., Kao C.H., Wang S.J. Focal cerebral hyper-perfusion in phantom limbs: assessed by Tc-99 HMPAO SPECT. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 2000; 16: 429 — 31.
41. Nandy D., Yianni J., Aziz T.Z. Phantom limb pain relieved with different modalities of central nervous system stimulation: a clinical and functional imaging case report of two patients. *Neuromodulation*. 2004; 7: 176 — 83.
42. Kooijman C.M., Dijkstra P.U., Jan H.B. et al. Phantom pain and phantom sensation in upper limb amputees: an epidemiological study. *Pain*. 2000; 87: 33-41.
43. Machin P., Williams A.C. Stiff upper lip: coping strategies of world war II veterans with phantom limb pain. *Clin. J. Pain*. 1998; 14: 290-4.
44. Sherman R.A., Sherman C.J. A comparison of phantom sensation among amputees whose amputations were of civilian and military origins. *Pain*. 1985; 21: 91-7.
45. Manchicanti L., Singh V. Managing phantom pain. *Pain Physician*. 2004; 7: 365 — 75.
46. Flor H. Phantom-limb pain: Characteristics, causes, and treatment. *Lancet. Neurol.* 2002; 1: 182 — 9.
47. Kats J., Melzack R. Auricular transcutaneous electrical stimulation (TENS) reduced phantom limb pain. *J. Pain Symptom Manage.* 1991; 6: 73 — 83.
48. Gnezdilov A.V., Surovegin A.V., Plaksin S.E., Ovechkin A.M., Ivanov A.M., Sultimov S.A. Study of the efficacy of percutaneous electroanalgesia when phantom pain syndrome. *Anesthesiologiya i reanimatologiya*. 1995; 2: 97 — 102.
49. Krainick J.U., Thoden U., Riechert T. Pain reduction in amputees by long-term spinal cord stimulation. Long-term follow-up study over 5 years. *J. Neurosurg.* 1980; 52: 346 — 50.
50. Bittar R.G., Otero S., Carter H., Aziz T.S. Deep brain stimulation for phantom limb pain. *J. Clin. Neurosci.* 2005; 12: 399 — 404.
51. Ahmed M.A., Mohamed S.A., Sayed D. Long-term antalgic effects of repetitive transcranial magnetic stimulation of motor cortex and serum beta-endorphin in patients with phantom pain. *Neurol. Res.* 2011; 33: 953 — 8.

52. Sluijter M., Cosman E., Ritman I., van Kleef M. The effects of pulsed radiofrequency field applied to the dorsal root ganglion — a preliminary report. *Pain Clin.* 1998; 11: 109 — 17.
53. Baron R., Wasner G., Lindner G. Optimal treatment of phantom limb pain in the elderly. *Drugs Aging.* 1998; 12: 361-76.
54. Rasmussen K.G., Rummans T.A. Electroconvulsive therapy for phantom limb pain. *Pain.* 2000; 85: 297-9.
55. Mercier C., Sirigu A. Training with virtual visual feedback to alleviate phantom limb pain. *Neurorehabil. Neural Repair.* 2009; 23: 587 — 94.
56. Wu C.L., Agarwal S., Raja S.N. Morphine versus mexiletine for treatment of postamputation pain: A randomized, placebo-controlled, crossover trial. *Anesthesiology.* 2008; 109: 289 — 96.
57. Bone M., Critchley p., Buggy D.J. Gabapentin in postamputation phantom limb pain: A randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over study. *Reg. Anesth. Pain Med.* 2002; 27: 481 — 6.
58. Robinson L.R., Czerniecki J.M., Jensen M.P. Trial of amitriptyline for relief of pain in amputees: Results of randomized controlled studi. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 2004; 85: 1- 6.
59. Jaeger H., Maier C. Calcitonin in phantom limb pain: A double-blind study. *Pain.* 1992; 48: 21 — 7.
60. Nicolajsen L., Cottrup H., Jensen T.S. Memantine (a N-methyl — D — aspartate receptor antagonist) in the treatment of neuropathic pain after amputation or surgery: A randomized, double-blinded, cross-over study. *Anesth. Analg.* 2009; 91: 960 — 6.
61. Vorobeichik J.M., Kukushkin M.L., Reshetnyak V.K., Ovechkin A.M., Gnezdilov A.V. Treatment of phantom-pain syndrome tinazidine. *Zhurnal nevrologii i psikhatrii im. S.S. Korsakova.* 1997; 97: (3): 36 — 9. (in Russian)
62. Danilova E.I., Grafova V.N., Reshetnyak V.K. Effects of phenazepam and sydnocarb at phantom-pain syndrome. *Experimentalnaya i klinicheskaya. farmakologiya.* 1994; 1: 11 — 3. (in Russian)
63. Kukushkin M.L., Ivanova L.G., Ovechkin A.M., Gnezdilov A.V., Reshetniak V.K. Differentiated integrated pharmacotherapy phantom-pain syndrome after amputation. *Anesthesiologiya i reanimatologiya.* 1996; 4: 39 — 42. (in Russian)
64. Nitsche M.A., Fricke K., Paulus W. Pharmacological modulation of cortical excitability shifts induced by transcranial direct current stimulation in humans. *J. Physiol.* 2003; 553: 293 — 301.
65. Stagg C.J., Best J.C., Johansen-Berg H. Polarity-sensitive modulation of cortical neurotransmitters by transcranial stimulation. *J. Neurosci.* 2009; 29: 5202 — 6.
66. Fregni F., Freedman S., Pascual-Leone A. Recent advances in the treatment of chronic pain with non-invasive brain stimulation techniques. *Lancet Neurol.* 2007; 6: 188 — 91.
67. Henry D.E., Chiodo A.E., Yang W. Central nervous system reorganization in a variety of chronic pain states: a review. *Pm.R.* 2011; 3: 1116 — 25.
68. Latremoliere A., Woolf C.J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J. Pain.* 2009; 10: 895 — 926.
69. Nardone R., Holler Y., Brigo F., Trinka E. Functional brain reorganization after spinal cord injury: systematic review of animal and human studies. *Brain Res.* 2013; 1504: 58 — 73.
70. Zhuo M. Central plasticity in pathological pain. *No-vartis Found Symp.* 2004; 261: 132 — 45.
71. Antal A., Paulus W. Effects of transcranial theta burst stimulation on acute pain perception. *Restor. Neurol. Neurosci.* 2010; 28: 477 — 84.
72. Lang N., Siebner H.R., Ward N.S., Frackowiak R.S. How does transcranial DC stimulation of the primary motor cortex alter regional neuronal activity in the human brain? *Eur.J. Neurosci.* 2005; 22: 495 — 504.
73. De Andrade D.C., Mhalla A., Adam F., Bouhassira D. Neuropharmacological basis of TMS-induced analgesia: the role of endogenous opioids. *Pain.* 2011; 152: 320 -6.
74. Maarrawi J., Peyron R., Garsia-Larrea L. Motor cortex stimulation for pain control induces changes in the endogenous opioid system. *Neurology.* 2007; 69: 827 — 34.
75. Mercier C., Leonard G. Interactions between pain and motor cortex: insights from research on phantom limb pain and complex regional pain syndrome. *Physiother. Can.* 2011; 63: 305 — 14.
76. Antal A., Terney D., Kuhn S., Paulus W. Anodal transcranial direct current stimulation of the motor cortex ameliorates pain and reduces short intracortical inhibition. *J. pain Symptom Vanage.* 2010; 39: 890 — 903.
77. Lefaucher J.P., Drouot X., Nguyen J.P. Motor cortex rTMS restores defective intracortical inhibition in chronic neuropathic pain. *Neurology.* 2006; 67: 1568 -74.
78. Kukushkin M. L., Igonkina S. I. Importance of GABA in the pathogenesis of pain syndromes. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya.* 2014; 1: 68-78. (in Russian)
79. Reilly K.T., Sirigu A. The motor cortex and its role in phantom limb phenomena. *Neuroscientist.* 2008; 14: 195 — 202.
80. Cagne M., Reilly K.T., Hety S., Mercier C. Motor control over the phantom limb in above-elbow amputees and its relationship with phantom limb pain. *Neuroscience.* 2009; 162: 78 — 86.
81. Giroux P., Sirigu A. Illusory movements of the paralyzed limb restore motor cortex activity. *Neuroimage.* 2003; 20: 107 — 11.
82. Moseley G.L., Flor H. Targeting cortical representations in the treatment of chronic pain: a review. *Neurorehabil. Neural Repair.* 2012; 26: 646 — 52.
83. Flor H., Muhlcnickel W., Taub E. A neural substrate for nonpainful phantom limb phenomena. *Neuroreport.* 2000; 11: 1407 — 11.
84. Vaso A., Adahan H-M., Devor M. Peripheral nervous system origin of phantom limb pain. *Pain.* 2014; 155: 1384 — 91.
85. Black J.A., Nikolajsen L., Jensen T.S., Waxman S.G. Multiple sodium channel isoforms and mitogen-activated protein kinases are present in painful human neuromas. *Ann. Neurol.* 2008; 64: 644 — 53.
86. Halbert J., Crotty M., Cameron I.D. Evidence for the optimal management of acute and chronic phantom pain: a systematic review. *Clin. J. Pain.* 2002; 18: 84 — 92.
87. Harris A.J. Cortical origin of pathological pain. *Lancet.* 1999; 354: 1464 — 6.
88. Knotkova H., Cruciani R.A., Tronier V.M., Rascche D. Current and future options for the management of phantom-limb pain. *J. Pain Res.* 2012; 5: 39 -49.
89. Melzack R. Phantom limbs, the self and the brain. *Can. Psychol.* 1998; 30: 1 — 16.

90. Moseley G.L., Gallace A., Spence C. Is mirror therapy all it is cracked up to be? Current evidence and future directions. *Pain*. 2008; 138: 7 — 10.

91. Kajander K.C., Wakisaka S., Bennett G.J. Spontaneous discharge originates in the dorsal root ganglion at the onset of a painful peripheral neuropathy in the rat. *Neurosci. Lett*. 1992; 138: 225 -228.

92. Kirk E Impulses in dorsal spinal nerve rootlets in cat and rabbits arising from dorsal root ganglia isolated from the periphery. *J. Comp. Neurol*. 1974; 2: 165 — 76.

93. Wall P.D., Devor M. Sensory afferent impulses originate from dorsal ganglia as well as from the periphery in normal and nerve injured rats. *Pain*. 1983; 17: 321 -39.

94. Babbedge R.C., Soper A.J., Cambell E.A., Urban L. In vitro characterization of peripheral afferent pathway of the rat after chronic sciatic nerve section. *J. Neurophysiol*. 1996; 76: 3169 — 77.

95. Liu C.N., Wall P.D., Ben-Dor E., Devor M. Tactile allodynia in the absence of C-fiber activation: altered firing properties of DRG neurons following spinal nerve injury. *Pain*. 2000; 85: 503 — 21.

Поступила 02.11.15

#### Сведения об авторах:

Кукушкин Михаил Львович, доктор мед. наук, проф., зав. лаб. клинической патофизиологии боли ФГБНУ НИИ ОПП, e-mail:

Гурко Наталья Сергеевна, канд. биол. наук, редактор I категории редакционно-издательской группы научно-организационного отдела ФГБНУ НИИ ОПП, e-mail ngourko@mail.ru

Пальцын А.А.<sup>1,2</sup>, Комиссарова С.В.<sup>1</sup>

## Возрастные изменения мозга

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

<sup>2</sup> — Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования  
Российская медицинская Академия последипломного образования, 123995, Москва, ул. Баррикадная, 2/1

*Первые морфологические признаки старения мозга обнаруживаются в белом веществе уже в молодом возрасте (20—40 лет), а позже (40—50 лет) и в сером. Начиная с 40—50 лет появляются и в дальнейшем становятся всё более заметными функциональные проявления морфологических изменений: ослабление сенсомоторных и когнитивных способностей. Хотя в принципе такая динамика возрастных изменений неотвратима, скорость её развития в большой степени определяется генетическими особенностями и образом жизни индивидуума. По современным представлениям возрастные изменения числа нервных клеток различны в разных отделах мозга. Однако эти изменения невелики и не являются главной причиной старческого увядания мозга. Главные процессы, обуславливающие деградацию мозга, развиваются как в телах нейронов, так и в нейропиле. В телах нейронов — это нарушение (чаще снижение) уровня экспрессии многих генов и, прежде всего, генов, определяющих клеточные коммуникации. В нейропиле: уменьшение числа синапсов и прочности синаптических соединений, уменьшение числа дендритных шипиков и аксональных бутонов, уменьшение числа и толщины дендритных ветвей, демиелинизация аксонов. Результатом перечисленных событий становится нарушение скорости образования и перестройки нейронных цепей. Скудеют ассоциативная способность, пластичность мозга, память.*

**Ключевые слова:** мозг; возраст; старение мозга; пластичность мозга; онтогенез.

**Для цитирования:** Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015; 59(4): 108-116

Paltsyn A.A.<sup>1,2</sup>, Komissarova S.V.<sup>1</sup>

## Age-related changes of the brain

<sup>1</sup> — Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow 125315, Russia

<sup>2</sup> — Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow 125315, Russia

*The first morphological signs of aging of the brain are found in the white matter already at a young age (20—40 years), and later (40—50 years) in a gray matter. After the 40—50 years appear and in subsequently are becoming more pronounced functional manifestations of morphological changes: the weakening of sensory-motor and cognitive abilities. While in principle this dynamic of age-related changes is inevitable, the rate of their development to a large extent determined by the genetic characteristics and lifestyle of the individual. According to modern concepts age-related changes in the number of nerve cells are different in different parts of the brain. However, these changes are not large and are not the main cause of senile decline brain. The main processes that contribute to the degradation of the brain develop as in the bodies of neurons and in neuropil. In the bodies of neurons — it is a damage (usually decrease) of the level of expression of many genes, and especially of the genes determining cell communication. In neuropil: reduction in the number of synapses and the strength of synaptic connections, reduction in the number of dendritic spines and axonal buttons, reduction in the number and thickness of the dendritic branches, demyelination of axons. As the result of these events, it becomes a violation of the rate of formation and rebuilding neuronal circuits. It is deplete associative ability, brain plasticity, and memory.*

**Key words:** brain; age; brain aging; brain plasticity; ontogenesis.

**For citation:** *Patologicheskaya Fiziologiya I eksperimentalnaya terapiya.* 2015; 59(4): 108-116

**For correspondence:** *Paltsyn A.A., e-mail: lrrp@mail.ru*

Структурно-функциональная разнородность отделов мозга отражается в существенных региональных различиях его возрастных изменений. Самая общая характеристика этих изменений может быть обозначена словом атрофия, функциональным проявлением которой является снижение сенсомоторной и когнитивной способно-

сти. Атрофия выражается уменьшением объема серого и белого вещества и увеличением объема цереброспинальной жидкости [1]. Годовое уменьшение объема мозга у взрослых людей составляет 0,2—0,5% [2, 3]. Гистологические исследования показывают, что эти макроскопические изменения обусловлены, прежде все-

**Для корреспонденции:** Пальцын Александр Александрович, e-mail: lrrp@mail.ru

го, частичной утратой нейропиля и, в меньшей степени уменьшением числа нейронов [4]. Более того, сообщают о сохранении числа нейронов во фронтальной и темпоральной коре во временном промежутке 56—103 года [5]. В то же время, прижизненные томографические исследования показывают, что фронтальная кора — область наиболее заметного возрастного сокращения объема [6, 7, 3]. Данные о сохранении числа нейронов во фронтальной коре и об уменьшении её объема не содержат противоречия. Возрастная утрата нейропиля может обусловить уменьшение объема коры без уменьшения числа нейронов. Причинами уменьшения объема мозга могут быть истончение отростков, прежде всего объемистых древовидных дендритов, уменьшение объема нейронов, уменьшение плотности расположения синапсов, утрата глиальных клеток, гипомиелинизация, уменьшение сосудистой сети.

Общую тенденцию снижения объема серого и белого вещества по мере старения можно считать доказанной. Большое значение представляют детали этих изменений. При исследовании (МРТ) 66 чел. от 23 до 81 года было обнаружено уменьшение объема серого вещества (в коре и подкорковых образованиях, амигдале, гиппокампе) начиная со среднего (41—59 лет) возраста с более ранним развитием во фронтальной коре [8]. Уменьшение объема белого вещества начиналось раньше, уже у молодых (23—40 лет) людей [3].

Снижение когнитивных, сенсорных и моторных способностей в старости не только общеизвестно, но и уточнено многими научными исследованиями. В многолетнем изучении большой (>10 000) выборки белых жителей Лондона обоего пола с образованием от неполного среднего до университетского в возрасте от 45 до 70 лет было установлено снижение когнитивных способностей уже в 45—49 лет, ускоряющееся в старших группах [9]. В исследовании 1138 более старых людей (средний возраст 79,6 года) наблюдавшихся в среднем 5,2 года, но не более 12 лет нашли общее снижение когнитивных способностей, хотя и существенно отличающееся по выраженности в зависимости от образа жизни [10]. Большое количество подобных сообщений согласуется с установленным *уменьшением объема мозга при старении*. Причинно-следственная связь этих явлений естественна. Вместе с тем большой интерес представляет изучения частных связей, т.е. конкретных особенностей структуры в конкретных областях мозга в сопоставлении с конкретными проявлениями функции этих областей. В аспекте структурно-функциональных зависимостей следует подчеркнуть значимость возрастной деградации белого вещества, поскольку она влияет на самую суть нервной деятельности — связи. Деградация белого вещества, кроме всего прочего, означает демиелинизацию, снижение скорости

прохождения импульса. В магнитно-резонансных изображениях белого веществ обнаруживается необычная область увеличения сигнала, усиливающаяся с возрастом white matter hyperintensities (WMH). В большинстве исследований обнаружено снижение различных когнитивных показателей при увеличении WMH [3]. У 420 исследованных (МРТ) в возрасте 60—70 лет обнаружили положительную связь степени сохранности белого вещества со скоростью усвоения информации [11].

Возрастные изменения числа нейронов у крыс исследовали путем фракционирования различных областей мозга и определения содержания нейрональных и не-нейрональных: NeuN (маркер нейронов) -негативных клеток [12]. Авторы обнаружили возрастание числа нейронов у животных в возрасте от 1 до 3 мес., когда содержание нейронов становилось максимальным во всех исследованных областях мозга. В коре, гиппокампе и мозжечке содержание не-нейрональных клеток от 1 до 3 мес. заметно не менялось. С трехмесячного срока начиналось постепенное, с нарастающей скоростью, сокращение числа нейронов. К двадцатидвухмесячному возрасту число нейронов снижалось сравнительно с их содержанием в 3 мес. в коре и мозжечке на 30%, в гиппокампе на 33%, в обонятельных луковицах на 17%. Содержание не-нейрональных клеток к 22 мес. существенно (на 34,5%) снизилось только в обонятельных луковицах. Общая масса мозга от 1 до 22 мес. увеличилась в 1,45 раза; коры на 24%, гиппокампа на 60%, мозжечка на 36%. Увеличение массы мозга в целом и в отдельных областях при уменьшении числа нейронов и, по крайней мере, не увеличении числа не-нейрональных клеток авторы объясняют увеличением размеров нейронов и глиоцитов.

Скорость возрастной утраты нейронов различна в зависимости от области мозга и типа нейронов. Есть сообщения о сохранении в старости числа нейронов у людей и макак в областях мозга, обеспечивающих память: гиппокампе и энторинальной коре [13, 14, 15]. У старых крыс количество нейронов в этих областях сохранялось даже при нарушении памяти [16]. Не обнаружена утрата нейронов в гиппокампе и у старых крыс с пониженной способностью к обучению [17]. Сохранение у старых мышей числа нейронов V слоя коры, пирамидных и гранулярных нейронов в гиппокампе, нейронов стриатума и таламуса сочеталось с 25% сокращением клеток Пуркинье у тех же животных [18].

### Механизм повреждения нейронов

Основной причиной повреждения или гибели нейронов и нарушения функций мозга в старости считается накопление ошибок в структуре ядерной и митохондриальной ДНК в нейронах [18, 19].

Главным механизмом повреждения ДНК является оксидативный (окислительный) стресс — действие реактивных форм кислорода (reactive oxygen species, ROS): супероксидного аниона, гидроксила, перекиси водорода, других окислителей и свободных радикалов. Они являются продуктами нормального метаболизма, но содержание их может увеличиваться под влиянием сверхнагрузки или некоторых факторов среды: ультрафиолета, ионизирующего излучения, промышленных загрязнений.

Действие метаболического стресса на митохондриальную ДНК — важный фактор в работе мозга [20, 21] и, конечно, влияет на возрастные изменения мозга, и всё же мы не стали эту тему обсуждать, чтобы не перегружать обзор. Нейроны особенно чувствительны к оксидативному стрессу по причине повышенного потребления кислорода, высокого содержания полиненасыщенных жирных кислот [22]. Когда количество ROS превышает норму меняется структура белков, липидов и ДНК [23, 24]. Описано связанное с возрастом нарастание повреждений ROS промоторов генов, обеспечивающих различные функции и, в частности, когнитивные способности [25].

Различают более сотни вариантов повреждения ядерной ДНК [9]. Наиболее часты среди них одноцепочечные разрывы (single-strand breaks — SSBs). За сутки в клетке действием ROS совершаются тысячи SSB [26]. Будучи нормальным компонентом метаболизма, ROS конечно вызывают повреждения ДНК и в физиологических концентрациях при действии не чрезвычайных, а обычных факторов среды. Показано увеличение числа двухцепочечных разрывов (double-strand breaks — DSBs) ДНК у молодых взрослых мышёй под действием физиологической нагрузки — исследования незнакомого окружения [27]. Наибольшее число DSB отмечено в зубчатой извилине — области ответственной за обучение и память. Возврат к исходному уровню DSB происходит в 24 часа. Увеличение нейрональной активности сенсорной стимуляцией, увеличивает выраженность DSB. Разумеется, при интенсивном разрушении ядерной ДНК нормальными и, тем более, экстремальными раздражителями жизнь была бы невозможна, если бы не существовала система репарации ДНК с различными молекулярными механизмами [26, 28]. Эффективность системы репарации ДНК снижается с возрастом [29]. Различные молекулярные варианты повреждения ДНК репарируются различными молекулярными механизмами. Один из них удаление поврежденных оснований — base excision repair — BER [28, 30]. Следует иметь в виду, что гены, обеспечивающие работу всех механизмов репарации, подвергаются оксидативному стрессу и другим повреждениям на общих основах с генами, репарируемыми

этим механизмами. Так уровень BER-белков изменяется при старении соответственно увеличению повреждений ДНК и геномной нестабильности [28]. Конечным выражением всех восстановительных механизмов является репаративный синтез ДНК, совершающийся в интерфазе, в отличие от репликативного синтеза ДНК в S-периоде, не свойственного нейронам взрослых млекопитающих [26]. На клеточном уровне, т.е. с идентификацией не ткани, а клеток, в которых происходит процесс, репаративный синтез ДНК может исследоваться, как и S-фазный синтез, автордиографическим методом по включению  $H^3$ -тимидина [31].

Изучение репаративного синтеза в отдельных видах нейронов в возрастном аспекте показало снижение уровня синтеза у стареющих мышёй в V слое пирамидных клеток коры, в пирамидных и гранулярных клетках гиппокампа, нейронах стриатума, но не в клетках Пуркинье. При исследовании повреждений ДНК найдено связанное со старостью накопление SSB в ядерной ДНК пирамидных нейронов V слоя, пирамидных и гранулярных нейронах гиппокампа, нейронах стриатума и отсутствие этого признака в клетках Пуркинье стареющих мышёй [19, 28]. Нейроны Пуркинье отличались наивысшим, но независимым от возраста уровнем SSB [19]. Высокая частота SSB в клетках Пуркинье согласуется с их повышенной, сравнительно с другими нейронами, чувствительностью к гипоксии [32, 33]. Нельзя утверждать, что указанная выше значительная утрата клеток Пуркинье в старости есть прямое следствие частоты SSB в них, но, возможно, это связанные явления. Интересная трактовка свойственных клеткам Пуркинье особенностей дана в статье Rutten'a и др. с названием: «меньше нейронов может быть лучше» [34]. Авторы допускают, что нейроны, в которых репарация ДНК, хотя и не устраняет все повреждения, но достаточна для предотвращения старческой гибели клетки, могут в дальнейшем из-за накопления геномных ошибок стать уязвимыми для патологических изменений; обусловить когнитивную недостаточность и подверженность патоморфозу Альцгеймеровского типа. Нейроны же подобные клеткам Пуркинье, которые вследствие высокой повреждаемости или низкой репарации утрачиваются с возрастом, представляют, по сути, вариант отбора дефектных форм. Их популяция избавляется, таким образом, от старческой дегенерации.

### Нейрогенез

В связи с вопросом об изменении числа нейронов в мозге, следует иметь в виду данные по размножению нейронов — нейрогенезу. В мозге есть области, в которых нейроны у взрослых и даже старых млекопита-

ющих могут не только утрачиваться, но и появляться вновь. Нейральные стволовые клетки (neural stem cells — NSCs) есть во многих областях мозга, но их пролиферация и дифференцировка обеспечивает пополнение числа нейронов только в зубчатой извилине гиппокампа и в обонятельных луковицах [35]. В других зонах мозга NSCs дифференцируются только в глиоциты. Новорожденные нейроны мигрируют в участки постоянной локализации: из субгранулярного в гранулярный слой зубчатой извилины и из субвентрикулярного слоя боковых желудочков в обонятельные луковицы. Здесь у них окончательно формируются дендриты и аксоны, и они встраиваются как промежуточные нейроны в местные сети. Нейрогенез — один из ключевых факторов синаптической пластичности взрослого мозга [36, 37]. От уровня нейрогенеза в зубчатой извилине зависят связанные с гиппокампом процессы обучения и памяти [36, 38]. Хотя нейрогенез продолжается в течение всей жизни, скорость его резко снижается у старых животных. Содержание нейробластов у мышей среднего возраста (7—9 мес.) по сравнению с молодыми (2 мес.) снижается на 80% [39]. Подавляется не только пролиферация NSCs, но и их дифференцировка в нейральные прогениторные клетки (neural progenitor cells — NPCs), дифференцировка NPCs в нейроны и выживание нейронов [40]. В эксперименте Bunk с соавторами в 2011 г. [41] у старых (8—15 лет) мармозеток нейрогенез снижался на 90% по сравнению с молодыми (< 3 лет). Методом магнитно-резонансной спектроскопии [42] удалось идентифицировать метаболиты, специфичные для NPCс в человеческом мозге *in vivo*. У взрослых людей эти маркеры не обнаруживаются в коре, но обнаруживаются в гиппокампе. Уменьшение сигнала этих маркеров у взрослых людей сравнительно с юными, согласуется с установленными традиционными методами возрастным подавлением нейрогенеза у млекопитающих. Подавление нейрогенеза (облучением, цитостатиками, трансгенными манипуляциями) ухудшает обучаемость и память [43, 44].

Анализ современной литературы по старению мозга убеждает, что старческой утрате подвержены не все виды нейронов и не во всех областях мозга. Поэтому утратой нейронов нельзя объяснить все проявления старения мозга. Более значимой причиной старческого угасания мозговых функций сейчас представляется развивающаяся с возрастом *недостаточность синаптических связей* [45—47].

### Возрастные изменения синапсов

Синапсы (связи) — способ и инструмент нервной деятельности и, как будет показано в дальнейшем тексте этого раздела, главный объект возрастных из-

менений в работе мозга. Впервые идею о межклеточных контактах нейронов как структурной основе памяти выдвинул Alexander Bain [48]. Она оставалась незамеченной более 20 лет до появления подобных высказываний Сантьяго Кахала [49]. Сейчас предположение о том, что память и вообще мыслительная деятельность осуществляется перестройками синаптических связей, является общепринятым [47].

Обнаружено зависимое от возраста уменьшение числа синапсов. Нага и др. в 2012 г. описали снижение плотности расположения синапсов, сочетающееся со снижением когнитивной функции у стареющих макаков [50].

В электронно-микроскопическом исследовании префронтальной коры у макаков резус Peters et al. [51, 52] обнаружили старческое уменьшение на 30% числа синапсов (сравнивали возрасты 5 и 30 лет) во 2/3 слоях, сочетающееся со снижением когнитивной способности. В пятом слое снижение было на 20%. Fu с соавторами [53] впервые показали на мышах, что возрастная потеря эфферентных синапсов может вносить вклад в снижение функции (слуха) и необязательно связана с возрастной потерей эфферентных нейронов. В эксперименте с водным лабиринтом Morris'a установлено уменьшение числа дендритных шипиков и глутаматергических синапсов (в ассоциативных зонах париетальной и медиальной префронтальной коры) у старых когнитивно нормальных и ещё более — у старых когнитивно ущербных крыс сравнительно с молодыми [54]. У старых макаков (24—25 лет) по сравнению с молодыми (9—12 лет) уменьшались: плотность расположения шипиков, диаметр, длина и разветвленность апикальных дендритов префронтальной коры (морфометрия, основанная на 3D реконструкции в конфокальном микроскопе) [53]. Электронно-микроскопическим исследованием префронтальной коры макаков обнаружена 30% утрата асимметричных (возбудительных) и симметричных (тормозных) синапсов с 5 до 30-летнего возраста во 2 и 3 слоях префронтальной коры [51]. Близкие величины возрастного уменьшения числа синапсов приведены в электронно-микроскопическом исследовании Dumitru et al. [55]. У старых (22—35 лет) макаков резус обнаружили снижение на 32% ( $p < 0,01$ ) сравнительно с молодыми (9—14 лет) плотности аксо-дендритных синапсов в пирамидальных нейронах III слоя префронтальной коры сочетающееся с угасанием когнитивных способностей. Технически очень сложное исследование [56] провели на молодых (10—12 лет) и старых (24—25 лет) макаках с прижизненной окраской нейронов (интраоперационное введение прочного голубого за 21 день до фиксации материала) и внутриклеточным введением красителя синапсов (Lucifer Yellow) в образцах префронтальной

коры. Авторы обнаружили уменьшение плотности шипиков на дендритах нейронов III слоя у старых животных. На апикальных дендритах плотность снижалась приблизительно равномерно на ветвях различного уровня. На базальных дендритах было заметно преимущественное снижение плотности на дистальных ветвях. Такие результаты, по мнению исследователей, указывают на то, что снижение памяти и когнитивные расстройства обуславливаются обеднением из-за недостаточности синапсов ассоциативных связей мозга.

В последнее время появилась возможность с помощью двухфотонного микроскопа хронически *in vivo* регистрировать изображения дендритных шипиков и аксональных бутонов [57—59].

В эксперименте, длящемся месяцы Lee с соавторами в 2006 г. [60] показал рост и перестройку дендритного дерева взрослых нейронов в поверхностных слоях коры у мышей. Это (по нашим поискам) первая работа, где умозрительные представления Bain'a и Кахалы были подтверждены непосредственным наблюдением роста и перестройки взрослых нейритов. Они вытягивали и сокращали ветви, а в некоторых случаях образовывали новые ответвления. Эти динамические реорганизации демонстрировали ГА-ВА-позитивные интернейроны.

Есть сообщения о внутрисинаптических изменениях, связанных с возрастом. Описано возрастное снижение синтеза нейротрансмиттеров и плотности их рецепторов [61, 62]. Эти изменения проявлялись снижением скорости проведения импульса [63], увеличением порога для потенциала действия у старых крыс в пирамидальных клетках гиппокампа CA1 [64] и пирамидах третьего слоя соматосенсорной коры [65]. Такие факты подтверждаются сообщениями об уменьшении скорости проведения импульса по аксонам пирамидальных нейронов у старых кошек [66]. Есть данные, что такие, связанные с возрастом, изменения в ЦНС происходят только в миелинизированных волокнах. Это согласуется с результатами морфологических исследований миелиновых оболочек у животных разного возраста [67] и уменьшением пластичности мозга [68].

Цитированные и подобные им исследования внесли существенные изменения в понимание сути синаптической недостаточности [69]. Она может быть обусловлена не только снижением численности синапсов. По данным Mostanu с соавторами (двухфотонная микроскопия и реконструкция по серийным электронно-микроскопическим срезам) дело заключается не в уменьшении числа синапсов. В пирамидных клетках соматосенсорной коры мышей плотность шипиков и аксональных бутонов увеличивается при взрослении, и остается стабильной от зрелости

(8—15 мес.) до старости (>20 мес.). Однако длительное (месяцы) сохранение стабильных шипиков ниже у старых животных. У старых шипики в среднем меньше, хотя и сохраняют способность образовывать связи. Таким образом, показано, что возрастной дефицит сенсорных восприятий связан не с потерей синапсов в соматосенсорной коре, а с изменениями в размере и стабильности шипиков и бутонов. Это может приводить к синаптической недостаточности, меньшей эффективности связей. Прижизненные данные двухфотонной микроскопии позволяют изучать динамику синаптических связей. В проведенном таким методом исследовании Grillo et al. [70] был получен неожиданный результат, представляющий динамику синаптических связей в значительной мере противоположно ранее сложившимся понятиям. Старческая кора (мыши 22—25 мес.) продемонстрировала резко увеличенную, сравнительно с молодой (4—6 мес.), скорость формирования, элиминации и дестабилизации аксональных бутонов. Для больших (предположительно обеспечивающих прочные связи) бутонов скорость дестабилизации отличалась в 10 раз, круговорот (цикл) бутонов — в 20 раз. Возрастных различий в размере и плотности расположения бутонов авторы не отметили. Увеличение скорости оборота и дестабилизации больших бутонов авторы считают указанием на то, что причина когнитивной недостаточности старческого мозга не недостаток синапсов или скорости их формирования, а *уменьшение прочности синаптических связей*.

Молекулярно-биологическим процессам в синапсах посвящена обширная литература. Мы берем из неё только самые общие характеристики возрастных изменений актуальные для нашей темы. Отсутствие нейрогенеза в большинстве областей мозга согласуется со способностью мозга (нейронов) пожизненно хранить информацию. По современным представлениям информация (память) «записывается» в связях нейронов. Получается, что для длительного и, тем более, пожизненного сохранения чего-то запомненного должна сохраняться связь некой комбинации синапсов. В то же время, как показывает исследование Grillo et al. [70] аксональным бутонам присуща высокая скорость формирования, элиминации и дестабилизации. Без способности синаптических связей к быстрым изменениям и перестройкам не было бы, столь же необходимой как память, пластичности мозга. Не было бы формирования памяти — запоминания впечатлений. Диалектическое условие сочетать память и пластичность, пока в конкретном выражении ещё неясно представляемое, всё-таки находит экспериментальное подтверждение в данных морфологических и молекулярно-биологических исследований. Fu и Zuo [71] описали ускоренное образование денд-



ритных шипиков при увеличении сенсорной и моторной нагрузки. Синапсы, как любой живой объект, претерпевают постоянное молекулярное и ультраструктурное обновление — оборот (turnover). Существенной стороной обновления синапсов являются два связанных явления: оборот везикулярных структур и гомеостаз ионов кальция —  $Ca^{2+}$  [72, 73, 77].

Одним из регуляторов многообразных сигнальных воздействий  $Ca^{2+}$  являются связывающие кальций белки ( $Ca^{2+}$  binding proteins — CBPs). Снижение буферной способности CBPs в старческих нейронах увеличивает внутриклеточную концентрацию  $Ca^{2+}$  или/и продлевает его действие. Поэтому CBPs считаются нейропротекторами [75, 76]. Более 250 белков могут быть CBPs и большинство их обнаруживается в мозге. Возрастные изменения экспрессии ряда цитоплазматических CBPs (parvalbumin, calbindin-D28K, calretinin, calmodulin, hippocalcin) различаются величиной в различных областях и клетках мозга, но однообразны по направленности: снижение экспрессии и утрата функции [75]. Кальциевые насосы плазматической мембраны способны быстро переместить значительные количества  $Ca^{2+}$  из цитоплазмы в межклеточное пространство, но функция этой транспортной системы также снижается с возрастом [76]. Причину этих нарушений гомеостаза кальция видят в окислительном повреждении CBPs и белков мембранных насосов [9].

Выявлена важная роль убиквитин-связанной деградации белков в синапсах и её влияние на структуру и функцию этих участков нейронных цепей [77]. Выяснение динамики экспрессии убиквитина в онтогенезе показало резкое (до 50—80%) снижение содержания этого белка в коре человека, обезьян и кошек. Снижение было селективным, оно не распространялось на другие синаптические белки. Понятно, что такие изменения становятся причиной снижения пластичности мозга [78].

Продолжая тему молекулярно-биологических механизмов пластичности нейронных сетей необходимо отметить влияние на рост и ветвление дендритов нейротрофических факторов: фактора роста нервов (nerve growth factor — NGF) нейротрофического фактора мозга (brain derived neurotrophic factor — BDNF), нейротрофинов 3 и 4 (neurotrophins 3 and 4 NT-3 and NT-4) [79]. Есть сообщения о снижении уровня нейротрофических факторов в старости [80].

### Возрастные изменения экспрессии генов

В качестве переходного от синаптических к генетическим событиям представляем исследование Beerl и др. [81], проводившееся в течение 20 лет. Они определяли содержание белка и мРНК семи синапти-

ческих маркеров (complexin-1, complexin-2, synaptophysin, synaptobrevin syntaxin, SNAP-25, septin-5) в 111 образцах мозга (выбранных 1600 потенциальных образцов) стариков в возрасте от 70 до 103 лет. Все участники не ранее чем за полгода до смерти прошли нейропсихиатрическое обследование с определением когнитивного статуса (clinical dementia rating). Сравнение уровней экспрессии маркерных белков и их генов у когнитивно интактных и когнитивно ущербных индивидуумов сопоставимого возраста обнаружило значительное снижение у последних. При деменции уменьшалось содержание всех маркеров, независимо от их роли в синаптической функции.

Мозг отличается от других органов высоким уровнем экспрессии генов, сложностью транскриптома, со множеством регуляторных элементов и генов с альтернативным сплайсингом. Из примерно 25000 генов, кодирующих белки, около 50% экспрессируются в мозге [82]. Появление метода ДНК-микрочипов (DNA microarray) позволило исследовать возрастные особенности экспрессии генов в мозге. В анализе нескольких сотен генов в мозге человека Fraser et al. в 2005 г. [83] показали достоверное изменение с годами уровня экспрессии (повышение или понижение) многих генов в коре и гораздо меньшее не достоверное изменение экспрессии тех же генов в мозжечке. Гены, повышающие уровень экспрессии в старой коре, слабо увеличивали уровень экспрессии в старом мозжечке, а гены, отличающиеся подавлением экспрессии в старой коре, почти не изменяли экспрессии в старом мозжечке. Получилось, что, по крайней мере, в отношении экспрессии генов мозжечок не стареет или стареет менее заметно.

Изучая возрастные (с 13 до 79 лет) изменения экспрессии 588 генов, Sibille [84] описал наибольшее снижение в старости экспрессии генов клеточных коммуникаций и сигнальных функций. Снижался уровень BDNF (brain-derived neurotrophic factor) и BDNF-зависимых генов, а также уровень других трофических факторов IGF (insulin-like growth factor), FGF (fibroblast growth factor). Снижение уровня экспрессии генов нейропептидов: соматостатина (SST), кортистатина (CORT), и нейропептида Y (neuropeptide Y — NPY) указывало на подавление функции ГАВАэргических ( $\gamma$ -aminobutyric acid — GABA) интернейронов, связанных с дендритами пирамидных клеток и, следовательно, на недостаточность ингибиторной импульсации. Lu и др., [85] исследовали фронтальную кору и описали возрастное (после 40 лет) снижение экспрессии генов, играющих центральную роль в работе мозга: генов синаптической пластичности, везикулярного транспорта и митохондриальной функции. Снижение коррелировало с возраст-зависимым повреждением ДНК промоторов этих генов. Penner и

др. [86] описали ДНК-метилирование гена Arc (activity regulated cytoskeletal-associated protein), гена-участника консолидации памяти и синаптической пластичности. Транскрипция этого гена снижалась у старых (24—32 мес.) крыс сравнительно со взрослыми (9—12 мес.). Повышенный уровень метилирования ДНК обнаружен в промоторной области этого гена в гиппокампе. Swain и Rao [87] исследовали экспрессию ферментов, обеспечивающих репарацию ДНК (base excision repair: BER) в коре крыс в возрасте 7, 180 и 720 дней. Обнаружили снижение активности этих ферментов у стареющих животных. О снижении у стариков и даже прекращении экспрессии генов, важных для обучения и памяти, сообщают Graff с соавторами [88]. В анализе методом РНК-секвенирования большого числа генов, осуществленном коллективом авторов из РМАПО и МГУ [82] было обнаружено, что наиболее резкие различия старого мозга от мозга взрослого человека относятся к нарушениям экспрессии генов, контролирующим клеточные сигнальные системы в неокортексе.

В заключение хотим подчеркнуть, что все, обусловленные возрастом, многообразные изменения мозга (уменьшение числа нейронов и скорости их обновления в нейрогенных зонах, уменьшение объема белого вещества и демиелинизация, уменьшение числа синапсов и прочности синаптических контактов, снижение скорости экспрессии генов и прежде всего генов, ответственных за клеточные коммуникации) действуют в одном направлении, а именно, нарушают суть нервной системы — нарушают связи.

## References

1. Lemaitre H., Goldman A.L., Sambataro F., Verchinski B.A., Meyer-Lindenberg A., Weinberger D.R. et al. Normal age-related brain morphometric changes: Nonuniformity across cortical thickness, surface area and grey matter volume? *Neurobiol. Aging*. 2012; 33(3): 617.e1-617.e9.
2. Fotenos A.F., Snyder A.Z., Gorton L.E., Morris J.C., Buckner R.L. Normative estimates of cross-sectional and longitudinal brain volume decline in aging and AD. *Neurology*. 2005; 64(6): 1032-39.
3. Salthouse T.A. Neuroanatomical substrates of age-related cognitive decline. *Psychol. Bull.* 2011; 137(5): 753-84.
4. Pakkenberg B., Pelvig D., Marnier L., Bundgaard M.J., Gundersen H.J., Nyengaard J.R. et al. Aging and the human neocortex. *Exp. Gerontol.* 2003; 38(1-2): 95-9.
5. Freeman S.H., Kandel R., Cruz L., Rozkalne A., Newell K., Frosch M.P. et al. Preservation of Neuronal Number Despite Age-Related Cortical Brain Atrophy In Elderly Subjects Without Alzheimer Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2008; 67(12): 1205-12.
6. Tisserand D.J., Pruessner J.C., Sanz Arigita E.J., van Boxtel M.P., Evans A.C., Jolles J. et al. Regional frontal cortical volumes decrease differentially in aging: an MRI study to compare volumetric approaches and voxel-based morphometry. *Neuroimage*. 2002; 17(2): 657-69.
7. Good C.D., Johnsrude I.S., Ashburner J., Henson R.N., Friston K.J., Frackowiak R.S. A voxel-based morphometric study of ageing in 465 normal adult human brains. *Neuroimage*. 2001; 14(1 Pt. 1): 21-36.
8. Giorgio A., Santelli L., Tomassini V., Bosnell R., Smith S., De Stefano N. et al. Age-related changes in grey and white matter structure throughout adulthood. *Neuroimage*. 2010; 51: 943-51.
9. Singh-Manoux A., Kivimaki M., Glymour M.M., Elbaz A., Berr C., Ebmeier K.P. et al. Timing of onset of cognitive decline: results from Whitehall II prospective cohort study. *BMJ*. 2011; 344: 7622.
10. James B.D., Wilson R.S., Barnes L.L., Bennett D.A. Late-Life Social Activity and Cognitive Decline in Old Age. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 2011; 17(6): 998-1005.
11. Penke L., Maniega S.M., Bastin M.E., Valdes Hernandez M.C., Murray C., Royle N.A. et al. Brain white matter tract integrity as a neural foundation for general intelligence. *Mol. Psychiatry*. 2012; 17(10): 1026-30.
12. Mortera P., Herculano-Houzel S. Age-related neuronal loss in the rat brain starts at the end of adolescence. *Frontiers in Neuroanatomy*. 2012; 6: Article 45.
13. West M.J., Gundersen H.J. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 1990; 296: 1-22.
14. West M.J., Coleman P.D., Flood D.G., Troncoso J.C. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet*. 1994; 344: 769-72.
15. Gazzaley A.H., Thakker M.M., Hof P.R., Morrison J.H. Preserved number of entorhinal cortex layer II neurons in aged macaque monkeys. *Neurobiol. Aging*. 1997; 18: 549-53.
16. Merrill D.A., Chiba A.A., Tuszyński M.H. Conservation of neuronal number and size in the entorhinal cortex of behaviorally characterized aged rats. *J. Comp. Neurol.* 2001; 438: 445-56.
17. Rapp P.R., Gallagher M. Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996; 93: 9926-30.
18. Brasnjevic I., Hof P.R., Steinbusch H.W.M., Schmitz C. Accumulation of nuclear DNA damage or neuron loss: Molecular basis for a new approach to understanding selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases. *DNA Repair (Amst.)*. 2008; 7(7): 1087-97.
19. Rutten B.P., Schmitz C., Gerlach O.H., Oyen H.M., de Mesquita E.B., Steinbusch H.W. et al. The aging brain: accumulation of DNA damage or neuron loss? *Neurobiol. Aging*. 2007; 28: 91-8.
20. Luk'janova L.D. Mitochondrial dysfunction — molecular mechanism of hypoxia. *Patogenez*. 2003; 1: 52-67. (in Russian)
21. Luk'janova L.D. Modern problems of adaptation to hypoxia. Signal pathways and their role in the system of regulation. *Patologicheskaja fiziologija i eksperimental'naja terapija*. 2011; 1: 3-19. (in Russian)
22. Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer's disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000; 71: 621S-29S.
23. Young I.S., Woodside J.V. Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* 2001; 54: 176-86.
24. Mora F. Successful brain aging: plasticity, environmental enrichment, and lifestyle. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2013; 15(1): 45-52.

25. Lu T., Pan Y., Kao S.Y., Li C., Kohane I., Chan J. et al. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature*. 2004; 429(6994): 883-91.
26. Caldecott K.W. DNA single-strand breaks and neurodegeneration. *DNA Repair*. 2004; 3: 875-82.
27. Suberbielle E., Sanchez P.E., Kravitz A.V., Wang X., Ho K., Eilertson K. et al. Physiologic brain activity causes DNA double-strand breaks in neurons, with exacerbation by amyloid- $\beta$ . *Nat. Neurosci.* 2013; 16(5): 613-21.
28. Bosshard M., Markkanen E., van Loon B. Base Excision Repair in Physiology and Pathology of the Central Nervous System. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13(12): 16172-222.
29. Li W., Vijg J. Measuring Genome Instability in Aging — A Mini-Review. *Gerontology*. 2012; 58(2): 129-38.
30. Sykora P., Wilson D.M. 3rd, Bohr V.A. Base excision repair in the mammalian brain: Implication for age related neurodegeneration. *Mech. Ageing Dev.* 2013; 134(10): 440-8.
31. Schmitz C., Axmacher B., Zunker U., Korh H. Age-related changes of DNA repair and mitochondrial DNA synthesis in the mouse brain. *Acta Neuropathol.* 1999; 97: 71-81.
32. Welsh J.P., Yuen G., Placantonakis D.G., Vu T.Q., Haiss F., O'Hearn E. et al. Why do Purkinje cells die so easily after global brain ischemia? Aldolase C, EAAT4, and the cerebellar contribution to posthypoxic myoclonus. *Adv. Neurol.* 2002; 89: 331-59.
33. Ardeshiri A., Kelley M.H., Korner I.P., Hurn P.D., Herson P.S. Mechanism of progesterone neuroprotection of rat cerebellar Purkinje cells following oxygen-glucose deprivation. *Eur. J. Neurosci.* 2006; 24(9): 2567-74.
34. Rutten B.P., Korh H., Steinbusch H.W., Schmitz C. The aging brain: less neurons could be better. *Mech. Ageing Dev.* 2003; 124(3): 349-55.
35. Gage F.H. Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000; 287(5457): 1433-38.
36. Zhao C., Deng W., Gage F.H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*. 2008; 132(4): 645-60.
37. Lazarini F., Lledo P.M. Is adult neurogenesis essential for olfaction? *Trends Neurosci.* 2011; 34(1): 20-30.
38. Drapeau E., Nora A.D. Stem cell review series: role of neurogenesis in age-related memory disorders. *Ageing Cell*. 2008; 7(4): 569-89.
39. Demars M.P., Hollands C., Zhao Kda T., Lazarov O. Soluble amyloid precursor protein- $\alpha$  rescues age-linked decline in neural progenitor cell proliferation. *Neurobiol. Ageing*. 2013; 34(10): 2431-40.
40. Lee S.W., Clemenson G.D., Gage F.H. New neurons in an aged brain. *Behav. Brain Res.* 2012; 227: 497-507.
41. Bunk E.C., Stelzer S., Hermann S., Schafers M., Schlatt S., Schwamborn J.C. Cellular organization of adult neurogenesis in the Common Marmoset. *Ageing Cell*. 2011; 10(1): 28-38.
42. Manganas L.N., Zhang X., Li Y., Hazel R.D., Smith S.D., Wagshul M.E. et al. Magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain. *Science*. 2007; 318: 980-5.
43. Dupret D., Revest J.M., Koehl M., Ichas F., De Giorgi F., Costet P. et al. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One*. 2008; 3(4): e1959.
44. Winocur G., Wojtowicz J.M., Sekeres M., Snyder J.S., Wang S. Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. *Hippocampus*. 2006; 16(3): 296-304.
45. Morrison J.H., Baxter M.G. The ageing cortical synapse: Hallmarks and implications for cognitive decline. *Nat. Rev. Neurosci.* 2012; 13(4): 240-50.
46. Jellinger K.A., Attems J. Neuropathological approaches to cerebral aging and neuroplasticity. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2013; 15(1): 29-43.
47. Arendt T. Synaptic plasticity and cell cycle activation in neurons are alternative effector pathways: the 'Dr. Jekyll and Mr. Hyde concept' of Alzheimer's disease or the yin and yang of neuroplasticity. *Progress in Neurobiology*. 2003; 71: 83-248.
48. Bain A. Mind and body. The Theories of their Relation. New York: D. Appleton & Company; 1872.
49. Cajal S.R. The croonian lecture. La fine structure des centres nerveux. *Proceedings of the Royal Society of London*. London: Harrison and Sons; 1894; LV: 444-68.
50. Hara Y., Rapp P.R., Morrison J.H. Neuronal and morphological bases of cognitive decline in aged rhesus monkeys. *AGE*. 2012; 34: 1051-73.
51. Peters A., Sethares C., Luebke J.I. Synapses are lost during aging in the primate prefrontal cortex. *Neuroscience*. 2008; 152(4): 970-81.
52. Fu B., Le Prell C., Simmons D., Lei D., Schrader A., Chen A.B. et al. Age-related synaptic loss of the medial olivocochlear efferent innervation. *Mol. Neurodegener.* 2010; 5: 53.
53. Kabaso D., Coskren P.J., Henry B.I., Hof P.R., Wearne S.L. The Electrotonic Structure of Pyramidal Neurons Contributing to Prefrontal Cortical Circuits in Macaque Monkeys Is Significantly Altered in Aging. *Cerebral Cortex*. 2009; 19: 2248-68.
54. Allard S., Scardochio T., Cuello A.C., Ribeiro-da-Silva A. Correlation of cognitive performance and morphological changes in neocortical pyramidal neurons in aging. *Neurobiol. Ageing*. 2012; 33(7): 1466-80.
55. Dumitriu D., Hao J., Hara Y., Kaufmann J., Janssen W.G., Lou W. et al. Selective changes in thin spine density and morphology in monkey prefrontal cortex correlate with aging-related cognitive impairment. *J. Neurosci.* 2010; 30(22): 7507-15.
56. Duan H., Wearne S.L., Rocher A.B., Macedo A., Morrison J.H., Hof P.R. Age-related dendritic and spine changes in corticocortically projecting neurons in macaque monkeys. *Cereb. Cortex*. 2003; 13(9): 950-61.
57. Denk W., Strickler J.H., Webb W.W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*. 1990; 5: 73-6.
58. Kim S.K., Eto K., Nabekura J. Synaptic structure and function in the mouse somatosensory cortex during chronic pain: in vivo two-photon imaging. *Neural Plast.* 2012. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/np/2012/640259/>
59. Stetter C., Hirschberg M., Nieswandt B., Ernestus R.I., Heckmann M., Siren A.L. An experimental protocol for *in vivo* imaging of neuronal structural plasticity with 2-photon microscopy in mice. *Exp. Transl. Stroke. Med.* 2013; 5: 9.
60. Lee W.C., Huang H., Feng G., Sanes J.R., Brown E.N., So P.T. et al. Dynamic remodeling of dendritic arbors in GABAergic interneurons of adult visual cortex. *PLoS Biol.* 2006; 4(2): e29.
61. Kaiser L.G., Schuff N., Cashdollar N., Weiner M.W. Age-related glutamate and glutamine concentration changes in normal human brain: 1H MR spectroscopy study at 4 T. *Neurobiol. Ageing*. 2005; 26(5): 665-72.

62. Ota M., Yasuno F., Ito H., Seki C., Nozaki S., Asada T. et al. Age-related decline of dopamine synthesis in the living human brain measured by positron emission tomography with L-[beta-11C]DOPA. *Life Sci.* 2006; 79(8): 730-6.
63. Miller D.B., O'Callaghan J.P. Review Effects of aging and stress on hippocampal structure and function. *Metabolism.* 2003; 52(10, Suppl 2): 17-21.
64. Matthews E.A., Linardakis J.M., Disterhoft J.F. The fast and slow afterhyperpolarizations are differentially modulated in hippocampal neurons by aging and learning. *J. Neurosci.* 2009; 29: 4750-55.
65. Hickmott P., Dinse H. Effects of aging on properties of the local circuit in rat primary somatosensory cortex (S1) in vitro. *Cereb. Cortex.* 2013; 23: 2500-13.
66. Xi M.C., Liu R.H., Engelhardt J.K., Morales F.R., Chase M.H. Changes in the axonal conduction velocity of pyramidal tract neurons in the aged cat. *Neuroscience.* 1999; 92(1): 219-25.
67. Peters A. The effects of normal aging on myelin and nerve fibers: a review. *J. Neurocytol.* 2002; 31: 581-93.
68. Burke S.N., Barnes C.A. Review Neural plasticity in the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006; 7(1): 30-40.
69. Mostany R., Anstey J.E., Crump K.L., Maco B., Knott G., Portera-Cailliau C. Altered synaptic dynamics during normal brain aging. *J. Neurosci.* 2013; 33(9): 4094-104.
70. Grillo F.W., Song S., Teles-Grilo Ruivo L.M., Huang L., Gao G., Knott G.W. et al. Increased axonal bouton dynamics in the aging mouse cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(16): E1514-E1523.
71. Fu M., Zuo Y. Experience-dependent Structural Plasticity in the Cortex. *Trends. Neurosci.* 2011; 34(4): 177-87.
72. Bezprozvanny I., Hiesinger P.R. The synaptic maintenance problem: membrane recycling, Ca<sup>2+</sup> homeostasis and late onset degeneration. *Mol. Neurodegener.* 2013; 8: 23.
73. Telese F., Gamliel A., Skowronska-Krawczyk D., Garcia-Bassets I., Rosenfeld M.G. «Seq-ing» Insights into the Epigenetics of Neuronal Gene Regulation. *Neuron.* 2013; 77(4): 606-23.
74. Gillingwater T.H., Wishart T.M. Mechanisms underlying synaptic vulnerability and degeneration in neurodegenerative disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2013; 39(4): 320-34.
75. Kumar A., Bodhinathan K., Foster T.C. Susceptibility to Calcium Dysregulation during Brain Aging. *Front. Aging Neurosci.* 2009; 1: 2.
76. Foster T.C. Review Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. *Aging Cell.* 2007; 6(3): 319-25.
77. DiAntonio A., Hicke L. Ubiquitin-dependent regulation of the synapse. *Annu. Rev. Neurosci.* 2004; 27: 223-46.
78. Williams K., Irwin D.A., Jones D.J., Murphy K.M. Dramatic loss of Ube3A expression during aging of the mammalian cortex. *Front. Aging Neurosci.* 2010. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2887038/>
79. Arikath J. Molecular mechanisms of dendrite morphogenesis. *Front. Cell Neurosci.* 2012; 6: 61.
80. Dwivedi Y. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in late-life depression. *Am. J. Geriatr. Psychiatry.* 2013; 21(5): 433-49.
81. Beerli M.S., Haroutunian V., Schmeidler J., Sano M., Fam P., Kavanaugh A. et al. Synaptic protein deficits are associated with dementia irrespective of extreme old age. *Neurobiol. Aging.* 2012; 33(6): 1125.e1-1125.e8.
82. Naumova O.Yu., Palejev D., Vlasova N.V., Lee M., Rychkov S.Y., Babich O.N. et al. Age-related changes of gene expression in the neocortex: Preliminary data on RNA-Seq of the transcriptome in three functionally distinct cortical areas. *Dev. Psychopathol.* 2012; 24(4): 1427-42.
83. Fraser H.B., Khaitovich Ph., Plotkin J.B., Paabo S., Eisen M.B. Aging and Gene Expression in the Primate Brain. *PLoS Biol.* 2005; 3(9): e274.
84. Sibille E. Molecular aging of the brain, neuroplasticity, and vulnerability to depression and other brain-related disorders. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2013; 15(1): 53-65.
85. Lu T., Pan Y., Kao S.Y., Li C., Kohane I., Chan J. et al. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature.* 2004; 429(6994): 883-91.
86. Penner M.R., Roth T.L., Chawla M.K., Hoang L.T., Roth E.D., Lubin F.D. et al. Age-related changes in Arc transcription and DNA methylation within the hippocampus. *Neurobiol. Aging.* 2011; 32(12): 2198-210.
87. Swain U., Rao K.S. Age-dependent decline of DNA base excision repair activity in rat cortical neurons. *Mech. Ageing Dev.* 2012; 133(4): 186-94.
88. Graff J., Kim D., Dobbin M.M., Tsai L.H. Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes. *Physiol. Rev.* 2011; 91(2): 603-49.

Поступила 12.11.2015

#### Сведения об авторах:

Пальцын Александр Александрович — доктор биологических наук, профессор, зав. лабораторий регуляции репаративных процессов ФГБНУ НИИОПП, профессор кафедры общей патологии и патофизиологии РМАПО.

Комиссарова Светлана Владимировна — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории регуляции репаративных процессов ФГБНУ НИИОПП.