

ПОЧТОВЫЙ АДРЕС:

125315, Москва, ул. Балтийская, 8.
Учреждение
Российской академии медицинских наук
НИИ Общей патологии
и патофизиологии РАМН.
Редакция журнала
«Патологическая физиология
и экспериментальная терапия».
Home page: www.medlit.ru
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.

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

Входит в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК России для публикации значимых результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук.

Журнал «Патологическая физиология и экспериментальная терапия» индексируется в следующих иностранных изданиях:
Index Medicus; 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

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

ISSN 0031-2991
Патологическая физиология и экспериментальная терапия.
2012. №1. 1–72.

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

Тираж 300 экз.
© ООО «Гениус Медиа», 2012.

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
ФГБУ «НИИОПП» РАМН**

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

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

**№1, 2012
ЯНВАРЬ—МАРТ**

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор Б.Б. Мороз

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

Редакционный совет

**Ю.В. Балякин (Москва), Ю.Ю. Бяловский (Рязань),
В.Т. Долгих (Омск), А.М. Дыгай (Томск),
А.А. Евтушенко (Кемерово), Д.А. Еникеев (Уфа),
Н.И. Кочетыгов (Санкт-Петербург), 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),
Г.С. Якобсон (Новосибирск), А.П. Ястребов (Екатеринбург)**

СОДЕРЖАНИЕ

- Хананашвили М.М.**
Теория переходного состояния
между нормой и патологией 3

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Чурина Е.Г., Новицкий В.В., Уразова О.И.,
Воронкова О.В., Наследникова И.О., Филинчук О.В.**
Субпопуляционный состав Т-регуляторных клеток
и пролиферативный ответ лимфоцитов крови *in vitro*
при туберкулёзе лёгких 13
- Черешнев В.А., Мазунина Л.С., Гейн С.В.,
Гаврилова Т.В., Черешнева М.В.**
Влияние миелопептидов на генерацию
активных форм кислорода и продукцию IL-1 β и TNF- α
клетками периферической крови 19
- Горячева А.В., Белкина Л.М., Терехина О.Л.,
Дауни Г.Ф., Маллет Р.Т., Смирин Б.В.,
Смирнова Е.А., Машина С.Ю., Манухина Е.Б.**
Роль предупреждения гиперпродукции оксида азота
в кардиопротекторном эффекте адаптации
к периодической гипоксии 23
- Бабаярова Ш.У., Охунув А.О., Комарин А.С.**
Активность NO-системы в лёгких
после различных объёмов их резекции 29
- Орехов А.Н., Собенин И.А., Орехова В.А.,
Мельниченко А.А., Мясоедова В.А., Мухамедова Н.М.,
Мартirosян Д.М., Пшежецкий А.В., Карагодин В.П.**
Клеточные тест-системы для выявления
антиатеросклеротической активности
фармакологических веществ
и изучения механизмов их действия 33
- Рукша Т.Г.**
Модуляция апоптоза форболмиристатацетатом
осуществляется независимо от уровня экспрессии TsPO
в клетках плоскоклеточного рака 40
- Зарубина И.В., Шабанов П.Д.**
Значение болевой чувствительности для устойчивости
к иммобилизационному стрессу 44
- Каплиев А.В., Овсъянников В.Г.**
Особенности бульбо-спинальной
серотонинергической реакции у крыс раннего возраста
при острой соматической боли 49
- Федотова Ю.О.**
Стимуляция D₂-типа дофаминовых рецепторов
улучшает пассивное обучение у самок крыс 53
- Шевченко Е.А., Успенская О.А.**
Исследование взаимосвязей факторов,
способствующих формированию персистенции
при урогенитальных инфекциях 57
- Лямина С.В., Шимшелашвили Ш.Л., Малышев И.Ю.**
Сурфактантный белок D — эндогенный регулятор
воспаления и иммунной защиты 60

ОБЗОРЫ

- Маслов Л.Н., Халиулин И.Г., Подоксёнов Ю.К.**
Нейропротекторный и кардиопротекторный эффекты
гипотермического прекодиционирования 67

CONTENTS

- Khananashvili M.M.**
Theory of transition state
between norm and pathology

ORIGINAL ARTICLES

- Churina Ye.G., Novitsky V.V., Urazova O.I.,
Voronkova O.V., Naslednikova I.O., Filinjuk O.V.**
Subpopulation structure of T-regulatory cells
and proliferative response of blood lymphocytes *in vitro*
under pulmonary tuberculosis
- Chereshnev V.A., Mazunina L.S., Gein S.V.,
Gavrilova T.V., Chereshneva M.V.**
Effect of myelopeptides
on reactive oxygen species' generation
and IL-1 β AND TNF- α production by peripheral blood cells
- Goryacheva A.V., Belkina L.M., Terekhina O.L.,
Downey H.F., Mallet R.T., Smirin B.V.,
Smirnova E.A., Mashina S.Yu., Manukhina E.B.**
Role of restricted nitric oxide overproduction
in the cardioprotective effect of adaptation
to intermittent hypoxia
- Babayarova Sh.U., Ohunov A.O., Komarin A.S.**
Activity of the NO-system in lung
after pulmonectomy of various volumes
- Orekhov A.N., Sobenin I.A., Orekhova V.A.,
Melnichenko A.A., Myasoedova V.A., Muhamedova N.M.,
Martirosyan D.M., Pchejetski A.V., Karagodin V.P.**
Cultured cell systems
for revelation
of new drugs antiatherosclerotic effects
and their mechanisms investigation
- Ruksha T.G.**
Apoptosis modulation by PMA
occurs independently of TsPO expression
in squamous cell carcinoma cells
- Zarubina I.V., Shabanov P.D.**
Significance of pain sensitivity for the resistance
to immobilization stress
- Kapliev A.V., Ovsjannikov V.G.**
The features of bulbo-spinal serotonergic reaction
in the young rats under the condition
of acute somatic pain
- Fedotova Yu.O.**
Stimulation of D₂-receptors
improves passive avoidance learning in female rats
- Shevchenko E.A., Uspenskaya O.A.**
Research of interrelations
of persistence-factors
for sexual-transmitted infections
- Lyamina S.V., Shimshelashvili Sh.L., Malyshev I.Yu.**
Surfactant protein D — endogenous regulator
of inflammation and immune defense

REVIEWS

- Maslov L.N., Khaliulin I.G., Podoksenov Yu.K.**
Neuroprotective and cardioprotective effects
of hypothermic preconditioning

М.М. Хананашвили

Теория переходного состояния между нормой и патологией

Учреждение Российской академии наук

Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем РАН,
123007, Москва, Хорошевское шоссе, 76а

В экспериментах на животных (грызуны, хищные, приматы) методом ситуационных условных рефлексов создавалась модель переходного состояния между нормой и патологией, свойственной человеку. Изучались вопросы, недоступные для решения на человеке по причинам технического и этического происхождения. Установлены особенности манифестации переходного состояния, его центральные механизмы и биологическая роль. Обнаружена бифункциональная природа переходного состояния — биологически положительная, защитная и биологически негативная, как состояние непосредственно предшествующее устойчивой патологии. Установлено, что в восходящем эволюционном ряду имеет место возрастание роли и усложнение механизмов биологически положительной составляющей переходного состояния, что объясняется развитой приспособительной деятельностью головного мозга к усложняющейся информационной среде и, в частности, к «информационной триаде» (сочетанию трех факторов — объема информации, фактора времени и уровня мотивации). Обнаружены «бессимптомные» закономерности переходного состояния и показана их роль в развитии патологии. Сформулирована теория переходного состояния как совокупность знаний и гипотез о явлениях, возникающих в организме в ответ на действие патогенного раздражителя. Обосновывается целесообразность классификации переходного состояния как явления, соответствующего по значению состояниям «норма — болезнь — клиническая смерть», т.е. рассматривать его в ранге основных состояний организма.

Ключевые слова: информационная патология, высшая нервная деятельность

М.М. Khananashvili

Theory of transition state between norm and pathology

State Scientific Center of the Russian Federation — Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences,
76-a, Horoshevskoye hwy., Moscow, 123007, Russia

In experiments on animals (rodents, carnivores, primates), using the methodology of situational conditioned reflexes, a model of the transition state between norm and pathology of humans has been created. We studied the problems that are not available to deal with on a person for technical and ethical reasons. Specific features of manifestation of the transition state, its central mechanisms and biological role were discovered. We found out bifunctional nature of the transition state — biologically positive, protective and biologically negative, like the state immediately preceding stable disease. It was established that in the ascending evolutionary series the increase in role and complexity of mechanisms of the positive component of the transition state occur. This fact can be explained by the development of adaptive activity of the brain, responding to the complex informational environment and, in particular, to so called «informational triad» (a combination of three factors — the amount of information, a factor time and level of motivation). We revealed «asymptomatic» phenomena of the transition state and showed its role in the development of pathology. A theory of the transition state was formulated as a summation of knowledge and hypotheses about the phenomena occurring in the body in response to a pathogenic stimulus. We proposed the classification of the transition state as a phenomenon, value of which is corresponding to the rate «norm — illness — clinical death», i.e. considering it in the rank of major states of the organism.

Key words: informational pathology, higher nervous activity

Переходное состояние (ПС) между нормой и патологией — это совокупность психобиологических явлений, возникающих в организме вслед за действием патогенного раздражителя — до появления симптомов устойчивой патологии. «Между» — это значит,

что ПС не ограничивается явлениями переходящими в патологию и завершающимися устойчивой патологией: оно включает и явления защитные, играющие биологически положительную роль, например, повышающие устойчивость организма к патогенным раздражителям; кроме того, оно включает явления, развивающиеся в «обратном» направлении — от патологии к норме, возвращая организм в состояние, в котором оно находилось до действия патогенного раздра-

Для корреспонденции: Хананашвили Михаил Михайлович, акад. РАМН, д-р мед. наук, проф., главн. науч. сотр. отд. «Психофизиология и оптимизация профессиональной деятельности операторов» ГНЦ РФ — ИМБП РАН. E-mail: info@imbp.ru

жителя. Все явления, имеющие место в ПС, характеризуются неустойчивостью (чем ПС и отличается от нормы и патологии) и, как правило, они переходят в качественно и/или количественно новое состояние, что и послужило основанием для обозначения периода между нормой и патологией как «переходное», — тем самым подчеркивая одно из главных отличительных черт этого состояния — его нестабильность. Если не учитывать в качестве основного это свойство ПС, то его можно определить как «промежуточное».

Несмотря на очевидное участие ПС в жизнедеятельности организма — достаточно указать на возможность его использования в целях управления процессами, ведущими к а) повышению устойчивости организма к патогенным раздражителям, б) прекращению или ослаблению действия механизмов, определяющих развитие патологии, в) активного или пассивного устранения или ослабления причины патологии, — оно изучено совершенно недостаточно по сравнению с такими состояниями организма как «норма» и «болезнь».

Одно из обстоятельств, затрудняющих изучение ПС у человека, заключается в том, что больной обращается к врачу после возникновения симптомов болезни, т.е. когда существенная составляющая «периода предболезни» — начало его развития — остается вне наблюдений врача или исследователя. Исключения составляют условия широкой диспансеризации, а также случаи наследственного предрасположения и профессиональные заболевания. Но это, действительно, исключение. Существенно ограничивают возможность изучения ПС у человека причины методического и этического характера. Эти и ряд других ограничений на пути исследования ПС у людей явились достаточным основанием для его изучения на животных, что и было реализовано нами путем моделирования у них ПС методами, близкими к условиям его возникновения у человека. Результаты этих исследований являются фактологической основой высказанных в статье теоретических положений.

Статья, в основном, концептуальная, но отдельным теоретическим положениям предшествует изложение лежащих в их основе наиболее очевидных, ключевых фактов, а также дается краткое описание наиболее важных методических приемов исследования. Более подробно результаты экспериментов представлены в цитируемой в тексте литературе.

Исследование относится к той части науки о мозге, которая известна как физиология и экспериментальная патология высшей нервной деятельности (экспериментальная психопатология). Моделирование ПС и его изучение осуществлено на грызунах, хищных, приматах, т.е. вопрос изучался в сравнительном эволюционном ряду, что позволило обнаружить ряд

закономерностей эволюции ПС, его межвидовые особенности у высших позвоночных. В статье использованы, главным образом, результаты исследований на собаках и, отчасти, на кошках и крысах. Однако, наиболее общие заключения о ПС делаются с учетом наблюдений и на других животных, а также на человеке.

Концептуальной основой моделирования ПС является представление об информационной патологии поведения (ИПП), (синонимы — информационная патология высшей нервной деятельности, информационная болезнь). Оно подробно описано в ряде публикаций [11, 12, 13] и, вкратце, сводится к следующему. ИПП — устойчивые нарушения высших функций головного мозга, а также опосредованные ими нарушения жизнедеятельности других систем организма, возникающие при длительной высшей (психической) нервной деятельности в условиях неблагоприятного сочетания следующих трех факторов:

- 1) информации, подлежащей обработке (включая этап принятия решения);
- 2) фактора времени, отведенного для такой работы мозга;
- 3) уровня мотивации, который и определяет значимость информации и необходимость ее обработки.

Сочетание этих трех факторов («информационная триада» [15—17]) может быть неблагоприятным, во-первых, если необходимо обработать большой объем информации при дефиците времени, отведенного для такой работы мозга и высоком уровне мотивации поведения и, во-вторых, если имеет место дефицит информации в течение длительного времени, а мотивация поведения высокая. И в одном, и в другом случае взаимодействуют три фактора, получивших название *информационная триада*.

Другая составляющая концепции об ИПП касается условий внешней и внутренней среды, сопутствующих неблагоприятному сочетанию факторов информационной триады. Они обозначаются, в отличие от факторов, составляющих информационную триаду («факторы первого порядка»), термином «факторы второго порядка». Речь идет, например, о хронической гиподинамии, свойственной профессиям умственного труда, о невесомости или колебаниях радиации при космических полетах и т.д. [2, 4]. Конечно, термин «факторы второго порядка» не означает их второстепенность. Некоторые из них настолько существенны, что носят экологически значимый характер. Они во многом определяют индивидуальный тип реагирования организма на неблагоприятное сочетание факторов информационной триады.

Используя термины «информационная триада», «объем информации», «фактор времени» и «уровень мотивации» мы придерживаемся следующего их опре-

деления. Под «информационной триадой» понимается комплекс трех факторов, участвующих в формировании условнорефлекторного поведения: информации, времени и мотивации. Их сочетание и обозначается как «информационная триада». При этом, в наших исследованиях, под «информацией» понимается условнорефлекторный раздражитель — определяющий конкретное индивидуально-выработанное поведение, сигнализирующий о необходимости, а число условных раздражителей, применяемых в течение эксперимента, определяет понятие «объем информации»: чем больше число условных раздражителей, используемых в течение одного эксперимента, тем больше объем информации, который животное должно переработать и принять решение. Изменение экспериментатором объема информации — в сторону его увеличения (или уменьшения — условие «хронического дефицита» информации) — при неизменном временном факторе и при высоком уровне мотивации, — является одним из приемов формирования ИПП и, соответственно, ПС — предшествующего ИПП.

Второй фактор информационной триады — «фактор времени» — это время, необходимое для обработки информации (в нашем случае — условнорефлекторных сигналов), приема пищи и возвращения на стартовое место. Этим завершается «временная единица поведения» — один цикл — и начинается отсчет новой «временной единицы» — нового цикла поведения. Напомним, что очередной условный раздражитель подается только при нахождении животного на стартовом месте.

Хроническое (длительное — из опыта в опыт) сокращение времени эксперимента при неизменной информационной нагрузке на высшую нервную деятельность (т.е. информационного фактора) и при высоком уровне мотивации поведения — еще один прием формирования ИПП и, соответственно, периода, предшествующего такой патологии, т.е. ПС.

Третий фактор информационной триады — мотивация, точнее уровень мотивации, создавался чувством голода, который удовлетворялся только при правильном решении задачи — выбором адекватной сигналу кормушки. Как отмечалось, условные рефлексы у собак вырабатывались на основе пищевого подкрепления условных раздражителей. Постоянный контроль за уровнем голода облегчался тем, что животные получали обычный (полный) рацион пищи один раз в сутки, в одно и то же время, что и позволяло регулировать уровень их мотивации.

При выработке оборонительных условных рефлексов мотивация поведения заключалась в избегании животным болевого электрокожного раздражения [5].

И вновь о термине «информационная триада». В многочисленных публикациях, посвященных причинам негативного (патогенного) влияния некоторых со-

временных условий жизнедеятельности человека, указывается на «возросший объем информации», «информационные перегрузки» и т.д. Между тем известно, и это подтверждается нашими исследованиями, мозг может переработать и усвоить огромный объем информации — без каких-либо признаков патологии — если только объем информации оптимально сочетается с фактором времени, отведенного на такую работу мозга, и с уровнем мотивации. Поэтому указание на «рост информации» как причины патологии следует принимать с большими оговорками и непременно учитывать наше представление об информационной триаде.

Прежде чем приступить к изложению результатов исследования, необходимо сделать несколько замечаний общего и методологического характера. «Общего», в данном случае, значит — замечаний, имеющих отношение не только к теме настоящего сообщения.

Принцип выбора методик исследований и последовательности их использования

Так, исследования ПС носили мультидисциплинарный характер, что, прежде всего, значит решение отдельных задач методами, имеющими отношение к разным уровням организации исследуемого явления и, часто, к разным научным дисциплинам. Конечно, такой подход не является новым. Он в полной мере соответствует глобальному принципу «системности», т.е. учитывает системный характер организации адаптивных функций (Н. Винер, Н.А. Бернштейн, П.К. Анохин и другие). Новое в наших исследованиях заключается в том, что была создана возможность одновременной (симультанной) регистрации функций разных органов (и систем) на разных уровнях их структурно-функциональной организации, что во многом способствовало выявлению механизмов, специфических для ПС.

Вопрос о последовательности решения отдельных задач, т.е. о логике постановки эксперимента, также требует рассмотрения. Начиная со второй половины XX века, аналитический подход к изучению головного мозга и его высших функций занял доминирующее положение, что сопровождалось существенным ослаблением интереса к интегральным явлениям и, соответственно, к подходам. Образно говоря, изучение одной клетки (нейрона коры), при условнорефлекторной реакции, относилось к «актуальным» и «прогрессивным», даже если результаты исследования не давали какой-либо информации о роли клетки в организации целостного поведения. В то же время, результаты изучения целостных реакций относились к «второстепенным», а сам подход, к «несовременным». Вслед, была допущена еще одна ошибка — исследования «на уровне клетки» были отнесены к «фундаментальным», в отличие от исследований на интегральном уровне, например, методом условных рефлексов. Сложилась си-

туация почти патовая: нейробиология на аналитическом пути исследования мозга (его функций) накопила огромное количество отдельных наблюдений, биологическое значение которых остается неидентифицированным, а это значит и неустраненным. Речь, конечно, не идет об аналитическом подходе, как принципе исследования, — без него знания о мозге оставались бы на уровне «черного ящика» или «стимул-реакции». Речь идет о том, чтобы вопрос целесообразности использования отдельных методик аналитического подхода рассматривался с учетом их пользы в изучении жизнедеятельности организма.

К сказанному следует добавить, что «фундаментальность» не определяется ни методиками исследования, ни, соответственно, уровнем организации изучаемого явления: результаты, установленные тонко-аналитическими методами, являются такими же «фундаментальными», как и результаты, установленные интегральными методами, если только и те и другие соответствуют требованиям, предъявляемым к фундаменту той или иной области знаний и как концептуально, так и методически могут способствовать их дальнейшему развитию.

С учетом всего сказанного и была построена логика нашего эксперимента. Так, первоначально была создана экспериментальная модель ПС на уровне целостной поведенческой деятельности организма методом условных рефлексов и идентифицированы имеющие место между нормой и патологией поведенческие реакции — определено их биологическое значение. Затем, на пути решения последующей задачи — изучения механизмов переходного состояния — были осуществлены исследования на разных уровнях его организации — нервных центров, клеточном, субклеточном, нейрохимическом. В этой последовательности и излагаются, вкратце, результаты наших исследований.

И еще, один — «вечный» в экспериментальной медицине, вопрос об адекватности модели, т.е. вопрос о сопоставимости результатов изучения животных с особенностями болезни человека. Особую остроту вопрос приобретает при моделировании патологии психических функций в виду наличия только у человека второй (речевой) сигнальной системы, что, конечно, ограничивает возможность моделирования психических функций на животных, но, тем не менее, метод условных рефлексов в определенных границах адекватен этой цели, в виду двойственной — физиологической и, одновременно, психической — природы явления условного рефлекса (Павлов).

Что касается информационной триады, как причины возникновения ИПП животного и информационной болезни человека, то их сопоставимость как по части этиологии, так и манифестации не должны вызывать сомнения.

Вопрос о возможных границах использования животных для изучения высшей нервной деятельности человека подробно рассматривался нами в других публикациях [3], где указывается и на его методологические аспекты.

Среди существующих методик изучения высшей нервной деятельности животных, в том числе вопросов ее патологии (и, соответственно, переходного состояния), предпочтение было отдано методу ситуационных условных рефлексов П.С. Купалова [6] — позволяющему изучать сложные формы поведения в условиях эксперимента, максимально приближенных к естественным, сохраняя, тем самым, и этологическую адекватность условий эксперимента.

Исследования на поведенческом уровне

Ниже приводится пример формирования ПС на поведенческом уровне исследования.

После выработки у собак двигательного-пищевых условных рефлексов в ответ на включение условного сигнала животное подбегает к одной из трех кормушек, расположенных на полу экспериментального помещения (5х6 м), из которой получает кусок мяса. Каждый условный раздражитель «связан» с одной из кормушек, и подкрепление производится только в том случае, если животное адекватно решает задачу, т.е. подбегает к кормушке, соответствующей сигнальному значению раздражителя. Обычно после поедания мяса животное немедленно возвращается на стартовое место, так как следующий условный раздражитель включается только при пребывании собаки на этом месте. Животное совершает условнорефлекторную реакцию немедленно, так как оно голодное, т.е. мотивация адекватного поведения высокая.

Иная картина наблюдается после нарушения оптимального соотношения факторов информационной триады, что достигалось, например, уменьшением времени эксперимента путем сокращения интервалов между сигналами. При этом не изменяется как высокий уровень мотивации, так и объем информационной нагрузки (животному предъявляется то же число условных раздражителей и той же сложности). В результате животное вынуждено осуществлять аналитико-синтетическую деятельность в том же объеме, но в условиях сокращенных отрезков времени. Уже после нескольких предъявлений сигнальных раздражителей в новых условиях наблюдается следующее изменение поведения: при включении сигнала животное сразу подбегает к соответствующей кормушке, быстро поедает пищу, но медленнее возвращается на стартовое место и, чем больше дефицит времени, отведенного на решение всей задачи, тем более увеличивается время возвращения животного на стартовое место. Таким поведением оно само увеличивает ин-

тервал между условными сигналами, а значит, и время всего эксперимента, т.е. устраняет «дефицит времени», чем приводит к оптимальному для себя соотношению параметров факторов информационной триады. Такое поведение способствует значительному увеличению периода между нормой и патологией, т.е. переходного состояния, а в ряде случаев, способствует и предотвращению развития патологии. Перед нами пример саморегуляции поведения — одно из проявлений биологически положительной составляющей ПС. С них — биологически положительных изменений в поведении, начинаются отклонения от исходного поведения («нормы»).

Основные поведенческие проявления, характеризующие биологически положительную составляющую ПС (в ответ на возникновение неблагоприятного сочетания факторов информационной триады):

- экзальтация ориентировочно-исследовательской реакции;
- повышение двигательной активности;
- увеличение самим животным межсигнального интервала — времени его возвращения на стартовое место;
- «игнорирование» части условных сигналов, хотя при этом животное в течении эксперимента получает меньше пищи, но такая форма саморегуляции увеличивает латентный период возникновения патологических симптомов;
- при рандомизированном (случайном) применении положительных и тормозных отрицательных условных раздражителей животное само «переключается» на стереотипное реагирование, т.е. подбегает к кормушке без учета сигнального значения раздражителя, например, совершает реакцию через раз;
- может наблюдаться возникновение кратковременного сна во время эксперимента: животное ложится на пол, засыпает в течение нескольких минут, после чего вскакивает и продолжает безошибочно реагировать на условные раздражители;
- груминг и кратковременное навязчивое почесывание кожных покровов;
- увеличение актов уринации;
- неспецифические изменения со стороны вегетативной системы — ЭКГ, артериального давления;
- со стороны ЭЭГ — превалирование спектра β -активности.

Все эти симптомы могут иметь место и при хроническом нарушении взаимодействия факторов информационной триады вследствие увеличения объема информации при неизменном временном факторе и высоком уровне мотивации поведения, а также вследствие изменения уровня мотивации при неизменных факторах времени и объема информации.

Все описанные симптомы биологически положительной составляющей ПС возникают начиная с пер-

вых же изменений в соотношении факторов информационной триады и, далее, с различным латентным периодом, который может продолжаться несколько экспериментальных дней. Если же они не возникают вообще или представлены в ослабленной форме, т.е. слабо выражены, или, возникнув, быстро ослабевают и исчезают, у животных появляются симптомы биологически негативной составляющей ПС, которые быстро фиксируются в долговременной памяти в виде устойчивых нарушений в поведении, т.е. патологии.

Итак, длительное (хроническое) пребывание животного в условиях неблагоприятного сочетания факторов информационной триады ведет к возникновению устойчивых патологических симптомов — состояния, которое мы и обозначаем как «информационную патологию поведения». Но, возникновению ИПП предшествуют такие изменения в поведении, которые препятствуют развитию патологии. Эти изменения в поведении и обозначаются нами как биологически положительная составляющая переходного состояния. Продолжительность их доминирования в переходном состоянии различна у разных особей и, в среднем, продолжается до трех недель. Некоторые из описанных поведенческих реакций, в ответ на патогенный раздражитель, долгое время понимались как «ранние симптомы патологии» и, соответственно, изучались и «создавались» методы их устранения (лечения), что, как это вытекает из наших наблюдений, не является обоснованным.

На определенном этапе развития биологически положительной составляющей переходного состояния возникают симптомы, которые относятся нами к периоду доминирования биологически негативной составляющей этого состояния и которое непосредственно предшествует возникновению стойких симптомов (синдрома) ИПП.

Биологически отрицательная составляющая переходного состояния

Согласно развиваемому представлению, в ответ на патогенный раздражитель, почти одновременно, возникают и развиваются две системы — биологически положительная и биологически отрицательная. Последняя имеет более высокий порог возникновения, поэтому начало ее формирования отстает от начала формирования биологической положительной составляющей. Кроме того, в начале переходного периода, биологически положительная система доминирует, но, в условиях продолжающегося действия патогенного фактора, усиливается отрицательная составляющая переходного состояния, что проявляется в возникновении, наряду с существующими, признаков, характерных для отрицательной составляющей ПС.

Основные поведенческие проявления, характеризующие биологически отрицательную составляющую переходного состояния:

- появление отдельных симптомов нарушений высшей нервной деятельности: отдельные ошибочные движения к кормушкам, не соответствующие сигнальному значению раздражителя;
- случаи «саморазвития» (аутокинез) негативных поведенческих и прочих проявлений жизнедеятельности, после устранения патогенного раздражителя;
- возрастающая экзальтация ориентировочно-исследовательской реакции, при ослаблении внимания к источникам условных раздражений;
- избегание стартового места;
- существенное увеличение межсигнальных двигательных реакций;
- продолжительное навязчивое почесывание кожных покровов;
- увеличение актов уринации и появление актов дефекации во время эксперимента;
- вспышки агрессивности, в том числе, направленные на источник условного раздражения — на «заменитель» безусловного;
- частые вспышки тахикардии;
- кратковременный подъем артериального давления во время эксперимента;
- непродолжительные изменения межсистемных отношений — появление отдельных признаков шизокинеза или синокинеза [16].

Все изменения в поведении, характеризующие биологически отрицательную составляющую ПС, не являются стабильными, они появляются в течение одного эксперимента и могут исчезнуть в течение того же эксперимента, но все это не является доминирующей характеристикой поведения: животное, в основном, проявляет адаптивное поведение, правильно реагирует на большинство сигналов. Вместе с тем, постепенно ослабевают и даже исчезают признаки поведения, обозначенные нами как показатели биологически положительной составляющей ПС. Наиболее типичным для биологически отрицательной составляющей является появление отдельных показателей нарушений высшей нервной деятельности и случаи их саморазвития — после устранения патогенного раздражителя. Говоря о «достаточно очерченных границах переходного состояния» мы отдаем себе отчет в том, что его корни, его истоки надо искать в другом основном состоянии — в норме, так же как некоторые признаки отрицательной составляющей переходного состояния продолжают в состоянии патологии. Целая гамма проявлений ПС была установлена и на крысах, кошках, приматах. О них будет сказано ниже, в разделе «эволюционные аспекты теории переходного состояния». Тем не менее, уже сейчас можно утверждать, что ПС играет безу-

словно важную роль в цикле всех основных состояний организма высших позвоночных, прежде всего, в протекании звена норма — болезнь, что стало достаточным основанием для поиска его механизмов — важно-го этапа на пути управления ПС.

Локомоторная самостимуляция головного мозга

Наблюдения, оказавшие существенное влияние на развиваемое представление о роли переходного состояния и его механизмах, были сделаны методом «локомоторной самостимуляции головного мозга» [18]. Суть его заключается в следующем.

Собаке в разные образования головного мозга вживляются раздражающие электроды, через которые пропускается электрический ток. При этом включение тока производится самим животным во время его перемещения по полу, разделенного на девять участков (по 1 м² каждый), 3 из которых «нейтральны», а 6 телеметрически связаны с определенной раздражающим электродом, т.е. с определенной мозговой структурой: как только животное становилось на один из таких участков пола, включалась стимуляция «соответствующего» ему (участку) образования мозга. Возможность выбора структуры мозга сочеталась с описанным выше процессом формирования ИПП — т.е. всего периода от начала действия патогенного раздражителя до возникновения патологии, включая, разумеется, и ПС.

Установлено, что уже на первом этапе развития ПС животное прекращает «бесприцельное» перемещение по экспериментальной комнате и длительно (в течение многих минут) задерживается на участке, связанном с прозрачной перегородкой (septum), тем самым осуществляя ее стимуляцию (самостимуляцию). Такое раздражение этой структуры задерживает во времени развитие негативной составляющей ПС и, соответственно, препятствует формированию ИПП. Аналогичный эффект, хотя и менее выраженный, наблюдается при самостимуляции латерального гипоталамуса или медиального отдела миндалины. Очевидно, что прозрачная перегородка, латеральный гипоталамус и медиальная часть миндалины составляют систему или часть лимбической системы, имеющей отношение к регуляции защитной функции головного мозга — повышающей его устойчивость к патогенному фактору. Такое представление о ПС подтверждается тем, что по мере продолжения действия патогенного раздражителя и возникновения ИПП животное «предпочитает» стимуляцию других структур, перемещается на другие квадраты экспериментального помещения и длительно задерживается на них, тем самым стимулирует другую систему головного мозга, имеющую отношение к механизму устойчивой патологии.

Обнаружение дифференцированных мишеней самостимуляции в цикле норма — переходное состояние — патология стало важным аргументом в пользу представления о существовании разных механизмов регуляции отдельных звеньев этого цикла.

Ультроструктурные исследования коры больших полушарий

На разных этапах цикла норма — переходное состояние — патология у собак осуществлялась прижизненная телеметрическая экстирпация небольших участков ($0,1 \text{ см}^2$) коры больших полушарий [13] и их ультроструктурное исследование. ПС и ИПП формировались вышеописанным методом ситуационных условных рефлексов [6]. Ультроструктурные исследования проведены сотрудниками лаборатории электронной микроскопии Ленинградского НИИЭМ АМН [8]. Результаты, представляющие интерес для настоящей статьи, сводятся к тому, что при глубокой ИПП имеют место деструктивные изменения в нейронах коры теменной области, а также в нейроглии. Кроме того, нарушения отмечены в синаптическом аппарате, т.е. в проводниковой межклеточной организации (подробно см. 8, 13). Эти изменения начинаются уже на этапе биологически отрицательной составляющей ПС, но, в отличие от изменений при ИПП, наблюдается большое количество лизосом, что, по существующим представлениям, указывает на активацию защитных механизмов в мозге на уровне ультроструктурной его организации. Эти изменения отсутствуют в норме и биологически положительной составляющей ПС. Подробно эти результаты обсуждаются в ряде публикаций [13, 14], здесь, однако, подчеркнем очевидное различие в структурно-функциональной организации коры на разных этапах всего цикла «норма — ПС — патология» и, особенно, на изменения, характерные для биологически негативной составляющей ПС, что, конечно, указывает на особенности механизмов формирования этого состояния.

Фармакологический подход к изучению природы переходного состояния

Представление о разной структурно-функциональной организации отдельных звеньев цикла «норма — ПС — патология» нашло подтверждение и в исследовании чувствительности этих звеньев к фармакологическим веществам. Это было обнаружено оригинальным методом, получившим название «самопримем лекарства» [18]. Его оригинальность заключается в предоставлении самому животному возможности выбора и приема раствора лекарственного вещества в течение всех фаз цикла: норма — ПС — болезнь. С этой целью животное (крыса) постоянно содержится в клетке (боксе) с смонтированными в одну из

ее стен тремя пипетками, две из которых содержат хорошо известные по своему действию фармакологические вещества (конкретно, например, амиридин и имипрамин) [19, 20]. Через третью — подается физиологический раствор (контроль). Каждая пипетка соединяется с резервуаром, заполняющимся раствором в одно и то же время суток. Снижение его уровня в резервуаре указывает на количество принятой жидкости в течение суток. Прием какой-либо другой жидкости исключается (питание по своему содержанию стабильное и неизменное). Один раз в сутки, в одно и то же время, животное переносится в экспериментальное помещение, где изучается ПС и ИПП по поведенческим показателям, после чего животное возвращается в бокс.

Основные результаты этих наблюдений сводятся к следующему. До начала действия патогенного раздражителя, т.е. в норме, животное предпочитает принимать физиологический раствор и, изредка, делает глоток из других пипеток. Так, 90% принимаемой жидкости в течение суток составляет физиологический раствор. Такое предпочтение приема физиологического раствора сохраняется и в начальном периоде ПС, однако, животное чаще подходит к другим пипеткам. Но, по мере продолжения действия условий неблагоприятного сочетания факторов информационной триады, — на этапе появления признаков негативной составляющей ПС, животное меняет выбор предпочитаемой пипетки, т.е. принимает теперь жидкость с содержанием амиридина, а при глубокой ИПП предпочитает принимать жидкость, содержащую имипрамин — дифференцированное профилактическое и лечебное действие которых при экспериментальных неврозах известно [5,14].

Главный вывод этих исследований, с учетом задач настоящей статьи, заключается в том, что животное, на разных этапах цикла норма — ПС — патология, проявляет дифференцированное отношение к лекарственным веществам, что указывает на неоднородную нейрофармакологическую чувствительность разных звеньев этого цикла, а значит и на их разную структурно-функциональную организацию.

Нейрохимические исследования головного мозга

Изложенные факты обусловили постановку задачи прямого изучения нейрохимических изменений в головном мозге, имеющих место при ПС, что, в логической цепи предпринятого научного поиска, понимается как следующее звено на пути достижения заключительной цели — разработки новых принципов и методов управления ПС фармакологическими веществами.

Опыты ставились на белых лабораторных крысах. Патология поведения и, следовательно, модель ПС формировалась по оригинальной модификации метода оборонительного условного рефлекса [5]. На основа-

нии поведенческих показателей выделялись состояния нормы, переходного состояния, патологии. На разных этапах нормы, ПС и ИПП производилась эвтаназия животных и головной мозг подвергался биохимическим исследованиям с соблюдением всех правил, обработки материала и его исследования [10]. Результаты сопоставлялись с результатами изучения поведения животных в норме и при ИПП. Исследовались неокортекс (проекционная зрительная и ассоциативная — теменная области), лимбическая структура мозга — перегородка, латеральный гипоталамус, дорсальный гиппокамп. Установлено, что период, совпадающий с доминированием биологически положительной составляющей и началом проявления негативной составляющей ПС, характеризуется нарастающим уменьшением числа дофаминергических рецепторов в некоторых лимбических структурах мозга. Эти изменения были выражены особенно ярко в септуме, что дало основание для предположения о существовании саморегуляционного механизма на уровне нейрохимической организации головного мозга и особой роли в этой системе перегородки мозга. Напомним, что опытами по электрической самостимуляции мозга была установлена необходимость в дополнительной активации (самим животным) именно септума, что, очевидно, компенсирует дефицит дофаминергических рецепторов уже на этапе, предшествующем устойчивой патологии [10]. Это наблюдение может рассматриваться как прямое доказательство существования специфических для переходного состояния механизмов регуляции поведения на нейрохимическом уровне его организации.

Эволюционные аспекты представления о переходном состоянии между нормой и патологией

Установлено, что у всех животных под влиянием патогенных раздражителей психогенной природы (информационной триады) возникает ИПП, которому предшествует ПС между нормой и патологией. У разных видов животных ПС имеет разную продолжительность и неоднотипную манифестацию. Так, у крыс ПС гораздо короче, чем у хищных и приматов. Далее, в восходящем эволюционном ряду манифестация ПС «обогащается» новыми симптомами. Существуют и четкие межвидовые различия, которые подробно описаны нами в других публикациях [13, 15]. Исследования ПС в эволюционном ряду позволило выявить следующую закономерность. От низших к высшим имеет место возрастание биологической роли ПС как важнейшего защитного механизма в цикле «норма — болезнь». Высокая степень развития ПС определяет и меру возрастания устойчивости нервной системы к патогенным раздражителям. В высшей степени интересно, что эта закономерность распространяется и на стоящие ниже в эволюционном ряду организмы. Так, А.И. Карамян, Д.А. Би-

рюков, В.В. Фанарджян, изучавшие экспериментальные неврозы у рыб и птиц, обнаружили, что у них, например, латентный период возникновения патологии чрезвычайно короток и что патология у них возникает на малейшее осложнение психогенной среды, например, у рыб увеличение системы сигналов даже на один условный раздражитель, вызывает нарушение всего условнорефлекторного поведения. Авторы не анализируют факты с позиции развиваемого нами представления о ПС, но опубликованные ими наблюдения дают основание для вывода о том, что у рыб и птиц ПС развито слабее, чем у грызунов и, тем более, у хищных. Это, с нашей точки зрения, и является причиной низкого порога возникновения у них ИПП.

Сопоставляя результаты наших исследований переходного состояния у грызунов, хищных и приматов, и учитывая описанные выше наблюдения на рыбах и птицах, нельзя не заметить закономерное увеличение латентного периода патологии в восходящем эволюционном ряду, что проявляется в продолжительности и в выраженности симптомов, определяемых нами как проявление переходного состояния между нормой и патологией. Обнаружение этой закономерности дает основание для ряда существенных заключений общепсихологического характера среди которых отметим следующее. В восходящем эволюционном ряду происходит возрастание биологического значения переходного состояния — его роли в жизнедеятельности организма, что, конкретно, отражается в прогрессивном развитии механизмов, повышающих их устойчивость к ИПП, т.е. к патологии психогенной природы.

Одновременно с исследованиями на животных были осуществлены наблюдения на людях путем:

а) создания биотехнических систем, позволяющих определить уровень протекания психических функций в разных условиях неблагоприятного сочетания факторов информационной триады [9];

б) наблюдений за студентами в предсессионный и сессионный периоды.

Разумеется, во всех случаях соблюдался принцип «не навреди». Обсуждение результатов исследований на человеке не является задачей настоящей статьи, но они учтены при формулировании теоретических обобщений о природе ПС; важно, что они подтверждают главные выводы, сделанные на животных. Здесь важно подчеркнуть, что, с учетом всей совокупности наблюдений, были созданы практические рекомендации по регулированию психофизиологического состояния человека (студентов) при возникновении затруднений высшей нервной деятельности в условиях неблагоприятного сочетания факторов информационной триады. Методические особенности исследований на человеке, результаты этих наблюдений и сведения о практических рекомендациях изложены в ряде сообщений [11, 16].

Выше были изложены примеры некоторых основополагающих наблюдений, составивших фактологическую основу теории переходного состояния. Остановимся на главных положениях этой теории.

Учитывая биологически важную роль переходного состояния, его достаточно очерченные границы, характерные для него проявления и свойственные ему механизмы, отличающие его от других основных состояний, прежде всего от нормы и патологии, считаем необходимым отнести его к основным состояниям организма и рассматривать его в ранге норма — переходное состояние — болезнь и, далее, — клиническая смерть, завершающаяся биологической смертью.

Переходное состояние между нормой и патологией несет две биологически разные функции: биологически положительную и биологически отрицательную. В этом смысле можно считать, что переходное состояние — явление бифункциональное. Предполагается, что на патогенный раздражитель в организме формируются две системы, прежде всего, биологически положительная, которая обеспечивает повышение сопротивляемости организма к патогенному фактору, иначе говоря, повышает устойчивость организма к дальнейшему действию патогенного раздражителя, а также формирует действие, направленное на устранение или ослабление самого раздражителя. Далее, под влиянием патогенного раздражителя возникает другая — биологически отрицательная система. Ее развитие в определенных условиях завершается формированием патологического синдрома (у человека — патологического состояния с очерченной нозологией).

Говоря о двух разных составляющих переходного состояния — положительной и отрицательной, — необходимо иметь в виду следующее. Биологически положительная система имеет более низкий порог возникновения, чем биологически отрицательная, поэтому, «отставание» во времени формирования отрицательной системы часто понимается как переход положительной составляющей в отрицательную. На самом деле, такого «перехода» биологической составляющей в негативную не существует. Биологически положительная система, возникнув, сохраняется все время действия патогенного фактора (хотя в ослабленной форме); она имеет место и в период болезни и, даже, в период клинической смерти.

В то же время, биологически отрицательная составляющая переходного состояния действительно переходит (при отсутствии факторов, мешающих такому развитию) в новое устойчивое патологическое состояние, приобретая это новое качество с момента фиксации патологических следов в долгосрочной памяти. Конечно, это вовсе не значит, что биологически положительная и отрицательная системы не взаимосвязаны. В здоровом организме все явления взаимосвязаны — это и опреде-

ляет его «целостность». Тем более в нашем случае взаимодействие двух систем происходит постоянно, но оно носит антагонистический характер (что тоже есть взаимодействие, хотя, очевидно, в этом случае говорить об их «взаимосодействии» не приходится).

Положение о переходном состоянии, как явлении бифункциональном, имеет важное практическое значение: речь идет, например, о существовании не одной «мишени» для воздействия (и, соответственно, для регуляции всего цикла жизнедеятельности), а двух. Если принять во внимание сказанное, как основу поиска новых путей регуляции всего цикла, то, очевидно, что не только в переходном состоянии, но и при болезни, и даже в состоянии клинической смерти организма, существует возможность лечения болезни не только путем подавления патологической системы, но и, одновременно, путем усиления биологически положительной составляющей. Практическое значение этого вывода не должно вызывать сомнения.

Биологически положительная и биологически отрицательная составляющие ПС развиваются с разной интенсивностью. Биологически положительная составляющая доминирует на первом его этапе. Она имеет характерную манифестацию, отражающую защитную, саморегуляционную деятельность головного мозга и свойственные ей механизмы (структурно-функциональную организацию). По мере усиления биологически отрицательной составляющей имеет место ослабление симптомов положительной составляющей, но, как говорилось, она не исчезает и не переходит в другое состояние.

Требуют критического пересмотра существующие представления о «ранних симптомах патологии» как и вывод, делаемый на этом основании, — о лечении этих «ранних симптомов патологии» (к тому же, «чем раньше, тем лучше»). Ранние изменения в поведении и в разных системах организма в ответ на патогенный раздражитель прежде всего отражают не патологическую, а в высшей степени важную, адаптивную деятельность головного мозга, которую следует не подавлять (лечить), а усиливать (поддерживать). Это положение имеет существенное практическое значение. С учетом изложенного требует пересмотра и распространенное в медицине словосочетание «латентный период болезни», завершающийся, согласно существующему представлению, первыми очевидными (т.е. видимыми) изменениями в жизнедеятельности организма в ответ на патогенный раздражитель. На самом деле такие изменения являются или могут быть не патологическими, а защитными и, следовательно, «бессимптомный» период, начинающийся вслед за действием патогенного раздражителя, является, прежде всего, периодом формирования защитных механизмов организма, а затем и латентным периодом болезни.

Биологически положительная составляющая переходного состояния существенно влияет на развитие всего цикла жизнедеятельности. Ее защитное биологическое значение особенно четко проявляется при сравнении результатов действия хронического неблагоприятного сочетания информационной триады с острым и очень сильным действием патогенного раздражителя, когда имеет место быстрое развитие патологии, т.е. когда ограничено во времени развитие положительной составляющей переходного состояния и ИПП развивается быстро.

Переходное состояние между нормой и патологией свойственно всем высшим животным. В восходящем эволюционном ряду его роль — прежде всего его биологически положительной составляющей — возрастает. Оно крайне слабо развито у низших, что определяет низкий порог возникновения у них информационной патологии.

Наряду с видоспецифическими особенностями проявления переходного состояния имеет место существование и индивидуальных различий как по спектру манифестации, так и по интенсивности проявления отдельных показателей переходного состояния у животных одного вида. Эти внутривидовые индивидуальные особенности в проявлении переходного состояния дают основание для постановки вопроса о существовании разных типов нервной системы, различаемых по показателю свойств ПС, т.е. для рассмотрения индивидуальных проявлений переходного состояния как отражения свойств разных типов нервной системы.

Таковы основные положения развиваемого представления о переходном состоянии между нормой и патологией.

В заключение необходимо отметить, что изложенные в статье теоретические представления основываются на результатах изучения высшей (психической) нервной деятельности, а это ставит вопрос об их значении для других форм проявления жизнедеятельности организма. Ответ на него требует соответствующих исследований, но, в любом случае, необходимо считаться с тем, что переходное (промежуточное) состояние между нормой и патологией — явление общебиологическое, а это позволяет надеяться, что содержание статьи окажется полезным и для других разделов медицинской науки и практики.

Список литературы

1. *Берташвили И.С.* Память позвоночных животных, ее характеристика и происхождение. — М.: Наука, 1974. — 275 с.
2. *Баевский Р.М., Казначеев В.П.* Диагноз донозологический. — М.: БМЭ, 1978. — Т. 7. — С. 253—255.
3. *Вахов В.П.* Уточнение понятий психической адаптации и дезадаптации в условиях регулярной активной

психопрофилактики // Российский психиатрический журнал. — 1997. — №1. — С. 32—35.

4. *Григорьев А.И., Баевский Р.М.* Концепция здоровья и космическая медицина. — М.: Слово, 2007. — 207 с.

5. *Доманидзе Т.Р., Хананашвили М.М.* Фармакологический эффект имипрамина на разных стадиях развития нейрогенного стресса у крыс // Известия Академии наук Грузии, сер. Биол. А. — 2006. — Т. 32, №5. — С. 975—978.

6. *Купалов П.С., Воеводина О.Н., Хананашвили М.М.* и др. Ситуационные условные рефлексы. — Л.: Медицина, 1964.

7. *Литвицкий П.Ф.* Экстремальные и терминальные состояния // Вопросы современной психиатрии. — 2010. — Т. 9, №3. — С. 74—80.

8. *Манина А.А.* Ультраструктурные основы деятельности мозга. — Л.: Медицина, 1976. — 184 с.

9. *Мещеряков В.А., Хананашвили М.М.* Исследование восприятия и переработки информации человеком-оператором с помощью малой ЭЦВМ // Вопросы психологии. — 1979. — №5. — С. 135—138.

10. *Никурадзе В.О., Чанишвили М.Ш., Доманидзе Т.Р., Хананашвили М.М.* Компенсаторные и патологические перестройки рецепторных систем мозга крыс в условиях адаптации и экспериментальной информационной патологии поведения // Вестник Российской академии медицинских наук. — М., 1992. — С. 35—39.

11. *Сомунджян А.А.* Некоторые вопросы диагностики, лечения и профилактики информационной патологии высшей нервной деятельности, возникающие в условиях гиподинамии (методические рекомендации). — Тбилисский ГИДУВ. — Тбилиси, 1982. — С. 9.

12. *Хананашвили М.М.* Информационные неврозы. — Л.: Медицина, 1978. — 135 с.

13. *Хананашвили М.М.* Патология высшей нервной деятельности. — М.: Медицина, 1983. — 274 с.

14. *Хананашвили М.М.* Учение И.П. Павлова о высшей нервной деятельности и фундаментальная психофармакология // Труды Всероссийского конгресса «Человек и лекарство». — М., 1998. — С. 41—54.

15. *Хананашвили М.М.* Психогенный стресс // Вестник Российской академии медицинских наук. — 1998. — №8. — С. 13—16.

16. *Хананашвили М.М.* Биологически положительный и отрицательный психогенный информационный стресс: Руководство для врачей и биологов. — М.: Медицина, 2002. — С. 275—306.

17. *Хананашвили М.М.* Проблема переходного состояния // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2007. — №2. — С. 2—6.

18. *Хананашвили М.М., Петров Е.С.* Методика локомоторной самостимуляции мозга // Журнал высшей нервной деятельности. — 1974. — №2. — С. 876—878.

19. *Хананашвили М.М., Орджоникидзе Ц.А., Голоберидзе М.В.* Регуляция форм психогенного стресса фармакологическими веществами ноотропной группы (амиридин, букридол). — М.: Труды Института медико-биологических проблем. — 2006. — С. 300—301.

20. *Цинцадзе Д.В., Карели Э.К., Хананашвили М.М.* Влияние амиридина на нарушение поведения, вызванное стрессом // Известия Академии наук Грузии. — 2000. — Т. 161, №3. — С. 512—514.

Поступила 12.11.2011

© Коллектив авторов, 2012
УДК 616.24-002.5:616.155.32-097-092.4:578.24

Е.Г. Чурина, В.В. Новицкий, О.И. Уразова, О.В. Воронкова, И.О. Наследникова, О.В. Филинчук

Субпопуляционный состав Т-регуляторных клеток и пролиферативный ответ лимфоцитов крови *in vitro* при туберкулезе легких

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, 634050, Томск, Московский тракт, 2

Проанализирован субпопуляционный состав Т-регуляторных клеток (Treg) периферической крови и пролиферативная активность лимфоцитов крови *in vitro* у больных с различными клиническими формами туберкулеза легких. Показано, что ведущую роль в формировании иммуносупрессии при инфильтративном, диссеминированном и фиброзно-кавернозном туберкулезе легких играют Trn — естественные (тимические) Treg с фенотипом CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. При этом их количество в крови повышено как у туберкулинположительных, так и у туберкулинотрицательных пациентов. Установлена отрицательная корреляция между количеством Trn и пролиферативной активностью лимфоцитов крови *in vitro* (базальной, митоген- и антигениндуцированной), свидетельствующая об участии Trn в угнетении пролиферации лимфоцитов и супрессии Th1- и Th2-иммунного ответа.

Ключевые слова: туберкулез легких, Т-регуляторные клетки, пролиферативная активность лимфоцитов

Ye.G. Churina, V.V. Novitsky, O.I. Urazova, O.V. Voronkova, I.O. Naslednikova, O.V. Filinjuk

Subpopulation structure of T-regulatory cells and proliferative response of blood lymphocytes *in vitro* under pulmonary tuberculosis

The Siberian State Medical University, 2, Moscovski Trakt, Tomsk, 634050, Russia

Subpopulation structure of T-regulatory cells and proliferative activity of blood lymphocytes *in vitro* in patients with different clinical forms of pulmonary tuberculosis were studied in this work. It has been shown that Trn — natural T-regulatory lymphocytes (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) play a leading role in formation of immune suppression under infiltrative, disseminated and fibrosis-cavernous pulmonary tuberculosis. Besides, their number is increased in blood of both tuberculin-positive and tuberculin-negative patients. Negative correlation between the number of Trn and proliferative activity of blood lymphocytes (basal, mitogen- and antigen-induced) has been established, which testifies about participation of Trn in suppression of lymphocyte proliferation and Th1- and Th2-immune response.

Key words: pulmonary tuberculosis, T-regulatory cells, lymphocytes proliferative activity

Контроль за распространением *Mycobacterium tuberculosis* осуществляется с вовлечением широкого спектра иммунокомпетентных клеток и продуцируемых ими цитокинов [2, 5]. В последнее десятилетие особое внимание уделяется изучению Т-регуляторных клеток (Treg), обладающих супрессорной активностью [1, 6, 9, 10]. Выделяют как минимум две разновидности Т-регуляторных клеток: естественные тимические Treg (Trn) с иммунофенотипом CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ и индуцированные на периферии Treg (Tri), как правило, с иммунофенотипами

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ и CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. При этом, супрессорной активностью обладают преимущественно Foxp3-экспрессирующие Treg, т.е. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺- и CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-лимфоциты [4]. Однако, роль Treg-лимфоцитов и механизмы их действия при инфекционных заболеваниях, в том числе при туберкулезе легких, до сих пор не изучены. Предполагается наличие двух основных путей реализации Treg супрессорного эффекта: контактно-зависимым способом и через продукцию иммуносупрессорных цитокинов (IL-10 и TGF-β) [3, 4, 6]. Кроме того, принципиальное значение для оценки функциональной активности Treg-лимфоцитов имеет определение пролиферативного ответа лимфоцитов на стимуляцию антигеном *in vitro* [6].

Для корреспонденции: Чурина Елена Георгиевна, канд. мед. наук, докторант каф. патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России. E-mail: lena1236@yandex.ru

Цель исследования: изучить субпопуляционный состав Т-регуляторных клеток и пролиферативную активность лимфоцитов крови *in vitro* у больных различными клиническими формами туберкулеза легких.

Методика

Было обследовано 69 пациентов с впервые выявленным туберкулезом легких (48 мужчин и 21 женщина в возрасте от 18 до 55 лет, средний возраст — 44 ± 12 лет). Диагноз туберкулеза легких (ТЛ) устанавливали на основании клинической картины заболевания, рентгенологического исследования легких, данных микроскопического и бактериологического исследования мокроты. Возбудитель туберкулеза выявляли методом прямой световой микроскопии мазка мокроты, окрашенного по Цилю—Нельсену, а также методом люминесцентной микроскопии с использованием флюорохромов (аурамина). Для видовой идентификации *M. tuberculosis* производили посев мокроты на плотные питательные среды Левенштейна—Йенсена и Финн-2. Все больные были разделены на три группы по клинической форме заболевания: группу с инфильтративным туберкулезом легких (ИТЛ) составили 42 чел., с диссеминированным — ДТЛ — 17, с фиброзно-кавернозным — ФКТЛ — 10 чел.

Всем обследованным лицам проводилось внутрикожное введение туберкулина (реакция Манту) в объеме 0,1 мл раствора, содержащего 2 туберкулиновых единицы (ТЕ). В основу деления больных с различными клиническими формами легочного туберкулеза на подгруппы была положена различная их реакция на внутрикожное введение туберкулина. В соответствии с этим принципом все больные были разделены на подгруппы с положительной (44 больных) и отрицательной (25 больных) реакцией на туберкулин.

Критериями исключения больных туберкулезом легких из исследования служили возраст менее 18 или более 55 лет, проведение вакцинации или ревакцинации ВССГ (в течение менее 3 лет до момента начала исследования) и другими вакцинами, недавно (менее 3 месяцев назад) перенесенная инфекция иной этиологии, острые и хронические (в стадии обострения) инфекционные и соматические заболевания, отягощенный аллергологический анамнез.

В контрольную группу были включены 16 здоровых доноров с аналогичными характеристиками по полу и возрасту (10 мужчин и 6 женщин в возрасте от 18 до 55 лет, средний возраст — 41 ± 7 лет).

Материалом исследования являлась периферическая венозная кровь. Забор крови проводили утром натощак из локтевой вены в количестве 10 мл.

Для определения сочетанной экспрессии CD4 и CD25 на лимфоцитах периферической крови и внутриклеточного маркера Foxp3 применяли метод про-

точной лазерной трехцветной цитометрии с использованием специфических моноклональных антител (МАТ), меченных флуоресцентными метками (FITC, PerCP; «Becton Dickinson (BD)», США). Для пермеабилзации и перфорации мембран лимфоцитов с целью определения внутриклеточного содержания Foxp3 использовали стандартные буферы из набора BD Pharmingen Human Foxp3 Buffer Set (США). Анализ образцов клеточных суспензий проводили на проточном цитометре FACSCalibur («Becton-Dickinson», США) с аргоновым лазером на основе определения четырех параметров: малого углового (FSC, характеризующего размер клетки) и бокового (SSC, характеризующего цитоплазматические и мембранные особенности клетки) светорассеяния, и трех показателей флуоресценции — зеленой (FITC — 530 нм), оранжевой (PE — 585 нм) и малиновой (PerCP — 610 нм) в гейте мононуклеарных клеток, выявляемых на FL1, FL2, FL3-каналах. Использовали автоматическое программное обеспечение и методы сбора и анализа данных с высоким разрешением (1024 канала).

Пролиферативную активность лимфоцитов крови *in vitro* оценивали с помощью предложенного J. Carmichael [1987] МТТ-теста, основанного на изменении цвета связывающегося с пролиферирующими клетками красителя 3-[4,5,-диметилтиазол-2ил]-2,5-дифенилтетразолием бромидом (МТТ, тиазол синий) из желтого в синий. Мононуклеары, выделенные в стерильных условиях, при концентрации клеточной взвеси $2,5 \cdot 10^6$ /мл культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах в среде RPMI-1640 (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 100 мкг/мл гентамицина и 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «БиолоТ», Россия) при 37°C и 5% CO₂ в течение 72 ч [Гольдберг Е.Д. с соавторами, 1992]. Для стимуляции пролиферации лимфоцитов в пробы вносили липополисахарид (ЛПС) (*Escherichia coli* 026:B6, «Sigma», США) в дозе 10 мкг/мл и очищенный туберкулин (PPD — purified protein derivate) («Биопрепарат», Санкт-Петербург) в дозе 50 ТЕ. В контрольные пробы добавляли полную среду RPMI-1640. После культивирования в каждую лунку вносили по 20 мкл МТТ (2 мг/мл) и инкубировали при 37°C в течение 4 ч. Затем супернатант удаляли, к осадку добавляли по 100 мкл диметилсульфоксида, ресуспендировали, переносили пробы в плоскодонный планшет и измеряли оптическую плотность на медицинском анализаторе Униплан («PICON», Россия) при длине волны 540 нм. В качестве контроля («нулевой» пробы) использовали физиологический раствор NaCl (0,9%). Результаты выражали в единицах оптической плотности.

Результаты исследования обрабатывали с использованием стандартного пакета программ SPSS v.11.0. Для всех имеющихся выборочных данных проверяли гипотезу нормальности распределения по критерию Шапиро—Уилка. Так как распределение выборок отличалось от нормального, рассчитывали медиану (Me), первый и третий квартили (Q_1 , Q_3). Для оценки достоверности различий выборок использовали критерии Манна—Уитни и Уилкоксона. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В основе иммунопатогенеза различных клинических форм туберкулеза легких лежат неоднозначные механизмы иммунного ответа на *M. tuberculosis* [2, 4, 5, 7]. С иммунологической точки зрения туберкулез является классическим примером аллергической реакции IV типа, т.е. клеточноопосредованного иммунного ответа. Однако в зависимости от характера течения туберкулезного процесса выделяют несколько форм специфического иммунного ответа, при этом для ИТЛ характерен Th1-ответ. В случае ДТЛ, как правило, преобладает Th2-ответ. Что же касается ФКТЛ, то у таких пациентов практически всегда

специфический иммунный ответ выражен слабо (Т-клеточная анергия), но возможен и другой вариант, когда при ФКТЛ задействованы оба типа иммунного ответа с преобладанием Th2, что характеризуется усиленной антителопродукцией, массивной бактериемией и, как следствие, деструкцией легочной ткани и казеозным некрозом [5, 7]. Известно, что Treg могут супрессировать любой тип иммунного ответа на любой стадии и, что принципиально важно, подавлять пролиферативный ответ лимфоцитов на антиген предположительно путем секреции ингибирующих пролиферацию цитокинов [8, 9, 10].

Согласно проведенному анализу, были зарегистрированы следующие значимые изменения количества Treg с фенотипом $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ в крови у больных туберкулезом легких: у больных ИТЛ и ФКТЛ с положительной реакцией на туберкулин было выявлено увеличение количества клеток данной субпопуляции относительно такового у здоровых доноров в 1,9 и 2,3 раза соответственно; у больных ДТЛ их количество существенно возрастало независимо от реакции на туберкулин (табл. 1). Наряду с этим у туберкулинположительных пациентов с ФКТЛ данный показатель оказался в 1,8 раза выше, чем у туберкулинотрицательных пациентов с указанной формой заболевания (табл. 1).

Таблица 1

Содержание субпопуляций Т-регуляторных клеток в периферической крови у больных туберкулезом легких, Me (Q_1 — Q_3)

Группы исследования		$CD4^+CD25^+FoxP3$	$CD4^+CD25^+FoxP3^+$	$CD4^+CD25^+FoxP3^+$
Здоровые доноры		25,45 (22,30—27,60)	2,63 (2,00—3,29)	5,00 (4,76—10,00)
Больные инфильтративным туберкулезом легких	С отрицательной реакцией на туберкулин	18,50 (15,50—28,50)	4,00 (3,00—8,00)	7,50 (5,00—8,50) $p_2=0,042$
	С положительной реакцией на туберкулин	25,50 (21,00—27,35)	5,00 (3,29—7,50) $p_1=0,024$	4,50 (3,50—6,00)
Больные диссеминированным туберкулезом легких	С отрицательной реакцией на туберкулин	16,50 (13,50—23,50)	7,00 (3,50—12,00) $p_1=0,022$	4,00 (3,50—5,50) $p_1=0,049$ $p_3=0,047$
	С положительной реакцией на туберкулин	18,50 (15,00—21,00) $p_1=0,047$	7,50 (4,00—10,00) $p_1=0,026$	4,50 (3,50—6,00)
Больные фиброзно-кавернозным туберкулезом легких	С отрицательной реакцией на туберкулин	26,00 (25,00—39,00) $p_3=0,041$ $p_4=0,033$	3,40 (2,00—4,00) $p_3=0,0338$ $p_4=0,039$	5,00 (3,00—14,00)
	С положительной реакцией на туберкулин	15,50 (13,00—18,00) $p_1=0,047$ $p_2=0,042$	6,10 (4,20—9,00) $p_1=0,044$ $p_2=0,039$	6,50 (2,00—11,00)

Примечание. p_1 — уровень статистической значимости различий по сравнению с соответствующими показателями у здоровых доноров; p_2 — у больных туберкулезом легких с положительной туберкулиновой реакцией; p_3 — по сравнению с больными инфильтративным туберкулезом легких; p_4 — по сравнению с больными диссеминированным туберкулезом легких

Известно, что Treg-клетки с фенотипом $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ «обучаются» в тимусе на этапе негативной селекции и покидают тимус как популяция естественных Treg (T_н), обладающая максимальной супрессорной активностью [4]. Продемонстрированное нами увеличение числа этих клеток в крови при всех клинических формах туберкулеза легких позволяет предположить, что именно T_н могут выполнять одну из основных иммуносупрессорных функций при туберкулезной инфекции.

При оценке количества $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg-лимфоцитов в крови у больных туберкулезом легких статистически значимое его снижение относительно группы здоровых доноров обнаруживалось только у туберкулинположительных пациентов с ДТЛ (в 1,4 раза) и ФКТЛ (в 1,6 раза). У остальных пациентов их количество было сопоставимым с контролем. При этом у туберкулинотрицательных пациентов с инфильтративной и диссеминированной формами заболевания количество $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg было ниже, чем у туберкулинотрицательных пациентов с ФКТЛ (табл. 1). Наряду с этим при ФКТЛ у больных с положительной пробой Манту обнаруживалось значимо (в 1,7 раза) более низкое количество $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg-клеток в крови по сравнению с туберкулинотрицательными больными с аналогичной формой заболевания (табл. 1).

Показано, что Foxp3-негативные Treg могут быть как тимического происхождения, так и генерироваться на периферии. Кроме того, данная субпопуляция лимфоцитов является гетерогенной и наряду с Treg включает в себя также активированные T-хелперы [3,4]. В связи с этим логично предположить, что снижение количества Treg с фенотипом $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ в крови могло происходить за счет иммунодепрессии клеточного звена иммунитета, сопровождающей течение туберкулезного процесса.

При оценке количества Treg с фенотипом $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ только у больных ДТЛ с отрицательной реакцией на туберкулин было зарегистрировано снижение их количества по сравнению со здоровыми донорами (в 1,25 раза). Кроме того, в группе туберкулинположительных больных с инфильтративной формой заболевания количество Treg с данным фенотипом было ниже (в 1,5 раза), чем у туберкулинотрицательных пациентов (табл. 1).

Принято считать, что Treg с данным фенотипом являются индуцированными на периферии в связи с отсутствием экспрессии на их поверхности CD25-маркера. Они приобретают супрессивные свойства и начинают экспрессировать маркер Foxp3 под влиянием цитокина-ингибитора TGF-β. Что же касается механизма супрессии иммунного ответа Treg с фенотипом $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, то он реализуется

посредством цитокин-зависимых реакций на периферии [4, 10]. С учетом полученных результатов можно думать, что, вероятно, эта субпопуляция T-регуляторных лимфоцитов не играет принципиальной роли в супрессии иммунного ответа при туберкулезе легких.

В дополнение к иммунофенотипированию T-регуляторных лимфоцитов нами была исследована пролиферативная активность лимфоцитов крови у туберкулинположительных пациентов с помощью МТТ-теста. Проводить данное исследование у туберкулинотрицательных больных мы сочли нецелесообразным, поскольку изначально туберкулиновая анергия свидетельствует о ППД-ареактивности исследуемых пациентов, что подтверждается результатами ряда других авторов [6]. ППД-ареактивными считаются пациенты, у которых пролиферативный ответ снижен на 50% и более [6]. При этом оценивалась пролиферативная активность спонтанная, при стимуляции клеток бактериальным липополисахаридом (ЛПС *Escherichia coli*) и туберкулином в дозе 50 ТЕ.

Согласно полученным результатам, у пациентов с туберкулезом легких всех исследуемых групп базальная пролиферация лимфоцитов крови (табл. 2) была пониженной, что свидетельствует об угнетении их функциональной активности. Стимуляция ЛПС индуцировала пролиферативный ответ лимфоцитов по сравнению с базальным уровнем пролиферации у здоровых лиц в 1,2 раза, у пациентов с ДТЛ в 1,9 раза и ФКТЛ — в 1,7 раза. Однако в целом уровень пролиферативной реакции лимфоцитов у больных туберкулезом легких указанных групп сохранялся более низким в сравнении с нормой. При этом у больных с ИТЛ ЛПС не оказывал существенного влияния на пролиферативную активность клеток (табл. 2).

При действии туберкулина в дозе 50 ТЕ уровень пролиферации лимфоцитов у здоровых доноров повышался в 1,3 раза, при ДТЛ — практически в 2 раза. У пациентов с ИТЛ туберкулин не оказывал влияния на пролиферативную активность лимфоцитов, равно как и у больных с ФКТЛ. В последнем случае она была вдвое ниже, чем при воздействии ЛПС (табл. 2).

Таким образом, отсутствие пролиферативного ответа лимфоцитов на ЛПС и ППД при ИТЛ свидетельствует о гипоэргии клеток, возможно, вследствие иммуносупрессии или функционального истощения в процессе ГЗТ-реакции. В то же время при ДТЛ ЛПС и туберкулин стимулировали пролиферацию лимфоцитов, что, на наш взгляд, является показателем адекватного Th1- и Th2-иммунного ответа. Выраженная ответная реакция лимфоцитов на ЛПС в условиях отрицательной их реакции на стимуляцию туберкулином при ФКТЛ свидетельствует об анергии лимфоцитов, специфичных к микобактериальному антигену. Учитыв-

вая тот факт, что ЛПС — митоген, преимущественно действующий на В-лимфоциты, можно предположить, что активация малоэффективного при туберкулезной инфекции Th2-ответа на фоне Th1-анергии при ФКТЛ является неблагоприятным фактором в плане прогноза течения и исходов заболевания.

При проведении анализа взаимосвязей между количеством изученных субпопуляций Treg и пролиферативной активностью лимфоцитов крови у больных туберкулезом легких с положительной реакцией на туберкулин вне зависимости от клинической формы заболевания нами была обнаружена отрицательная корреляция между количеством Treg с фенотипом CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ и пролиферацией лимфоцитов — базальной ($r=0,58, p<0,05$) и стимулированной ЛПС ($r=0,61, p<0,05$) и ППД ($r=0,68, p<0,05$) (табл. 3). Это позволяет предполагать, что именно Treg-клетки оказывают негативный эффект на проли-

ферацию лимфоцитов и, как уже указывалось выше, являются ведущим фактором иммуносупрессии при туберкулезе легких.

Наряду с этим была установлена положительная корреляция между количеством Treg с фенотипом CD4⁺CD25⁺Foxp3 и пролиферативной активностью лимфоцитов — базальной ($r=0,41, p<0,05$), при действии ЛПС ($r=0,45, p<0,05$) и ППД ($r=0,49, p<0,05$) (табл. 3). Следовательно, не исключается возможность, что данный тип клеток может стимулировать функциональную активность и пролиферацию лимфоцитов, т.е. не обладает супрессорной активностью. В свете изложенных выше данных логично предположить, что этому эффекту могли способствовать входящие в состав указанной субпопуляции активированные CD4⁺CD25⁺ Т-лимфоциты-хелперы [3, 4].

Таблица 2

Пролиферативная активность лимфоцитов крови *in vitro* у пациентов с различными формами туберкулеза легких с положительной реакцией на туберкулин в МТТ-тесте (единицы оптической плотности), Me (Q₁–Q₃)

Группы исследования	Пролиферативная активность (опт.ед.)		
	Базальная	При стимуляции ЛПС	При стимуляции ППД
Здоровые доноры	0,25 (0,24–0,29)	0,31 (0,26–0,46) p ₃ <0,05	0,32 (0,24–0,37) p ₃ <0,05
Больные инфильтративным туберкулезом легких	0,16 (0,10–0,21) p ₁ <0,05	0,17 (0,04–0,22) p ₁ <0,05	0,17 (0,05–0,25) p ₁ <0,05
Больные диссеминированным туберкулезом легких	0,12 (0,11–0,17) p ₁ <0,05	0,23 (0,18–0,25) p ₁ <0,05 p ₃ <0,05	0,23 (0,09–0,26) p ₁ <0,05 p ₃ <0,05
Больные фиброзно-кавернозным туберкулезом легких	0,15 (0,11–0,17) p ₁ <0,05	0,25 (0,20–0,29) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05	0,11 (0,11–0,12) p ₁ <0,05 p ₄ <0,05 p ₅ <0,05

Примечание. p₁ — уровень статистической значимости различий по сравнению с соответствующими показателями у здоровых доноров; p₂ — по сравнению с больными инфильтративным туберкулезом легких; p₃ — по сравнению с базальным уровнем пролиферации; p₄ — по сравнению с уровнем пролиферации при стимуляции клеток ЛПС, p₅ — по сравнению с больными диссеминированным туберкулезом легких

Таблица 3

Коэффициенты взаимной сопряженности Спирмена (непараметрическая корреляция) между содержанием субпопуляций Treg в крови и пролиферативной активностью лимфоцитов *in vitro* у больных туберкулезом легких с положительной реакцией на туберкулин

Параметры исследования	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺
Базальная пролиферация лимфоцитов	r=0,41 p ₁ <0,05	r= 0,58 p ₁ <0,05	r= 0,15
Пролиферация лимфоцитов при стимуляции ЛПС	r=0,45 p ₁ <0,05	r= 0,61 p ₁ <0,05	r= 0,21
Пролиферация лимфоцитов при стимуляции ППД	r=0,49 p ₁ <0,05	r= 0,67 p ₁ <0,05	r= 0,16

Примечание. p₁<0,05 — уровень статистической значимости взаимосвязей

Что же касается Treg с фенотипом CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, то между их количеством и пролиферативной активностью лимфоцитов корреляций обнаружено не было (табл. 3), т.е. данная субпопуляция Treg, по-видимому, не влияет на пролиферацию лимфоцитов при туберкулезе легких.

Таким образом:

- оценка пролиферативной активности лимфоцитов крови *in vitro* показала что лимфоциты крови у больных ИТЛ являются как ЛПС-, так и ППД-арективными, что свидетельствует о супрессии Th1- и Th2-ответа. При этом у больных с диссеминированным туберкулезом легких лимфоциты проявляют пролиферативную реакцию на действие неспецифического и антигенного стимулов, в то время как у больных с фиброзно-кавернозным туберкулезом легких лимфоциты при адекватном ответе на неспецифическую стимуляцию ЛПС демонстрируют отрицательный ответ на ППД, что является признаком анергии антигенспецифических клеток;

- ведущую роль в формировании иммуносупрессии при инфильтративном, диссеминированном и фиброзно-кавернозном туберкулезе легких играют T_H17 — естественные (тимические) T-регуляторные лимфоциты. При этом отмечается повышение их числа в крови как у туберкулинположительных, так и туберкулинотрицательных пациентов;

- проведение корреляционного анализа позволило установить, что количество T_H17 в крови у больных туберкулезом легких находится в отрицательной зависимости по отношению к пролиферативной активности лимфоцитов (базальной, митоген- и антигениндуцированной). Их количество возрастает у ППД-арективных больных вне зависимости от клинической формы заболевания. Вероятно, данная субпопуляция Treg ответственна за угнетение пролиферации лимфоцитов и формирование T-клеточной анергии при туберкулезной инфекции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и образованию в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013».

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК 16.512.11.2046).

Список литературы

1. **Воробьев А.А., Быковская С.Н., Пашков Е.П., Быков А.С.** Роль клеток-регуляторов CD4⁺CD25⁺ в развитии хронических инфекционных заболеваний // Вестник российской академии медицинских наук. — 2006. — №9—10. — С. 24—29.
2. **Мишин В.Ю., Борисов С.Е., Аксенов В.А.** и др. Диагностика и химиотерапия туберкулеза органов дыхания // Проблемы туберкулеза. — 2005. — №3. — С. 47—64.
3. **Кетлинский С.А., Симбирцев А.С.** Цитокины. — СПб.: ООО «Издательство Фолиант», 2008. — 552 с.
4. **Мейл Д., Бростофф Дж., Рот Д.Б., Роитт А.** Иммунология / Пер. с англ. — М.: Логосфера, 2007. — 568 с.
5. **Новицкий В.В., Симицына В.А., Воронкова О.В.** и др. Цитокинпродуцирующая активность мононуклеарных лейкоцитов периферической крови у больных туберкулезом легких до лечения и на фоне химиотерапии // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2005. — №6. — С. 39—42.
6. **Сахно Л.В., Тихонова М.А., Курганова Е.В.** Т-клеточная анергия в патогенезе иммунной недостаточности при туберкулезе легких // Проблемы туберкулеза. — 2004. — №11. — С. 23—28.
7. Туберкулез. Патогенез, защита, контроль / Пер. с англ. / Под ред. Барри Р. Блума. — М.: Медицина, 2002. — 696 с.
8. **Beissert S., Schwarz A., Schwarz T.** Regulatory T cells // Journal of Investigative Dermatology. — 2006. — Vol. 126. — P. 15—24.
9. **Hayday A., Tigelaar R.** Immunoregulation in the tissues by T cells // Nature Reviews. — 2003. — Vol. 3. — P. 233—242.
10. **Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M.** Regulatory T cells and immune tolerance // Cell. — 2008. — Vol. 133. — P. 775—787.

Поступила 07.12.2010

Сведения об авторах:

Новицкий Вячеслав Викторович, акад. РАМН, д-р мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии, ректор ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России

Уразова Ольга Ивановна, д-р мед. наук, проф. каф. патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России

Воронкова Ольга Владимировна, д-р мед. наук, проф. каф. ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России

Наследникова Ирина Олеговна, д-р мед. наук, проф. каф. патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России

Филинюк Ольга Владимировна, канд. мед. наук, доцент каф. фтизиатрии и пульмонологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России

В.А. Черешнев^{1,2,3}, Л.С. Мазунина¹, С.В. Гейн^{1,2}, Т.В. Гаврилова⁴, М.В. Черешнева³

Влияние миелопептидов на генерацию активных форм кислорода и продукцию IL-1 β и TNF- α клетками периферической крови

¹ Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, 614081, Пермь, ул. Голева, 13

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет», 614990, Пермь, ул. Букирева, 15

³ Учреждение Российской академии наук Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, 620049, Екатеринбург, ул. Первомайская, 106

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермская государственная медицинская академия им. академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, 614000, Пермь, ул. Куйбышева, 39

Миелопептиды МП-3, МП-5 и МП-6 угнетали индуцированную зимозаном продукцию активных форм кислорода лейкоцитами как при одномоментном внесении, так и в условиях предварительной обработки. Все исследуемые миелопептиды при одномоментном внесении в культуры с зимозаном снижали стимулированную зимозаном 1500 мкг/мл продукцию IL-1 β и активировали спонтанную продукцию данного цитокина клетками цельной крови. Продукция TNF- α под влиянием миелопептидов снижалась в культурах с зимозаном 150 мкг/мл. В условиях предобработки, миелопептиды на продукцию IL-1 β и TNF- α не влияли, за исключением единичного стимулирующего влияния МП-5 на уровень IL-1 β в спонтанных культурах. При сравнительном анализе различий в направленности и выраженности эффектов различных миелопептидов выявлено не было, что предполагает наличие единого механизма действия у данной группы пептидных биорегуляторов.

Ключевые слова: активные формы кислорода, миелопептиды, интерлейкины

V.A. Chereshevnev^{1,2,3}, L.S. Mazunina¹, S.V. Gein^{1,2}, T.V. Gavrilova⁴, M.V. Cheresheva³

Effect of myelopeptides on reactive oxygen species` generation and IL-1 β and TNF- α production by peripheral blood cells

¹ Institute of ecology and genetics of microorganisms UB RAS, 13, Golev str., UB RAS, Perm, 614081, Russia

² Perm State University, 14, Bukireva str., Perm, 614990, Russia

³ Institute of Immunology and Physiology of the UB RAS, 106, Pervomayskaya str., Yekaterinburg, 620049, Russia

⁴ Perm State Academy of Medicine, 39, Kuybysheva str., Perm, 614000, Russia

Myelopeptides MP-3, MP-5, and MP-6 were found to suppress zymosan-induced production of reactive oxygen species by leukocytes both under one-way introduction and under pretreatment. All of myelopeptides under examination in case of one-way introduction in cultures with zymosan demonstrated a decrease in zymosan-stimulated (1500 mkg/ml) production of IL-1 β , and activation of spontaneous production of this cytokine by whole blood cells. TNF- α production under myelopeptide effect was lowered in cultures with 150 mkg/ml zymosan. Under pretreatment myelopeptides did not render effect on IL-1 β and TNF- α production, with the exception of single stimulating effect of MP-5 on IL-1 β level in spontaneous cultures. Using comparative analysis the difference in direction and expressivity of effects of various myelopeptides was not revealed that suggests the existence of common mechanism of action in this group of peptide bioregulators.

Key words: reactive oxygen species, myelopeptides, interleukins

В настоящее время очевидным является тот факт, что иммунная система многокомпонентна и ее функционирование обеспечивается сложной сетью взаимосвязанных информационных сигналов, опосредуемых эндогенными информационными субстанциями [5, 7]. Помимо цито-

кинов, представляющих собой полипептидные макромолекулы, в процессах иммунорегуляции участвуют низкомолекулярные пептиды 3 классов: нейропептиды, пептиды тимуса и пептиды костного мозга (миелопептиды). Миелопептиды представляют собой группу биорегуляторных пептидов костномозгового происхождения, обладающую широким спектром иммуномодулирующей активности [9]. В настоящее время из супернатантов куль-

Для корреспонденции: Гейн Сергей Владимирович, д-р мед. наук, вед. науч. сотр. ИЭГМУрО РАН, проф. кафедры микробиологии и иммунологии ПГНИУ. E-mail: gein@iegmu.ru

тур клеток костного мозга выделено 6 отдельных миелопептидов (МП-1, МП-2, МП-3, МП-4, МП-5, МП-6), модулирующих функции как адаптивного, так и врожденного иммунитета [5].

Врожденный иммунитет является наиболее древним звеном иммунной системы, включающим в себя спектр факторов, отвечающих за быстрое распознавание, уничтожение и элиминацию патогенного биоматериала. Он включает в себя ряд секреторных (лизоцим, интерфероны, система комплемента, медиаторы воспаления) и клеточных (гранулоциты, моноциты-макрофаги, дендритные, НК-клетки) компонентов, которые взаимодействуют с определенными классами антигенов, характерных для целого ряда патогенных организмов. После контакта клетки с патогеном происходит её активация с индукцией провоспалительного ответа, включающего продукцию активных форм кислорода и флогенных цитокинов.

В настоящей работе нами исследованы функции МП-3 как основного модулятора функций клеток врожденного иммунитета, а также МП-5 и МП-6, дифференцировочных факторов, иммунорегуляторное действие которых в настоящее время изучено недостаточно. Ранее нами было показано угнетающее влияние миелопептидов МП-1, МП-3, МП-5, МП-6 на ФГА-индуцированный пролиферативный ответ лимфоцитов и ЛПС-индуцированную продукцию IL-1 β [3, 4].

Цель работы — исследование влияния миелопептидов МП-3, МП-5 и МП-6 на продукцию активных форм кислорода и провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF- α лейкоцитами периферической крови при различных вариантах внесения миелопептидов в культуры.

Методика

В качестве объекта исследования продукции активных форм кислорода использовали нефракционированные лейкоциты периферической крови здоровых доноров добровольцев в возрасте от 20 до 22 лет. Нефракционированную лейкоцитарную взвесь получали путем отстаивания гепаринизированной венозной крови в течение 2 ч при 37°C.

Оценка кислородзависимой микробицидной активности лейкоцитов осуществлялась с использованием реакции люминолзависимой хемилюминесценции (ЛХЗЛ). Реакцию проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах («Greiner», Германия), каждая лунка содержала 10⁵ клеток в 100 мкл раствора Хенкса. В качестве индуктора ЛХЗЛ использовали опсонизированный зимозан в концентрации 150 и 1500 мкг/мл. В качестве маркера выраженности реакции ЛХЗЛ использовался люминол (10⁻⁵М), свечение которого неизбирательно по отношению к различным кислородсодержащим радикалам [10]. Регистрацию результатов проводили в течение 1 ч с помощью многофункционального спектрофотометра TECAN (Австрия).

Продукцию провоспалительных цитокинов исследовали в культурах цельной крови [8]. Для этого 10 мкл цельной гепаринизированной крови культивировали в 96-луночных планшетах в полной питательной среде (ГПС), приготовленной на основе RPMI-1640 с добавлением 10 мМ HEPES («Sigma»), 2 мМ L-глутамин («Sigma»), 100 мкг/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Санкт-Петербург). Миелопептиды вносили в культуры в концентрациях МП-3 — 10⁸ г/мл, МП-5 и МП-6 — 10⁷ г/мл в двух вариантах — одновременно с индуктором и за 30 мин до внесения индуктора. В качестве индуктора синтеза цитокинов использовали опсонизированный зимозан в концентрациях 150 и 1500 мкг/мл. Определение концентрации IL-1 β и TNF- α в супернатантах культур проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов «Вектор-Бест» (Новосибирск). Статистическая обработка данных производилась с использованием парного *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Как видно из рис. 1 и 2, в варианте одномоментного внесения миелопептидов с индуктором в лейкоцитарных культурах, стимулированных зимозаном (150 мкг/мл), все исследуемые миелопептиды, начиная с 25-й мин реакции, проявляют угнетающее действие на продукцию активных форм кислорода. В присутствии зимозана в концентрации (1500 мкг/мл) миелопептиды угнетают синтез кислородных радикалов с 15-й по 60-ю мин реакции. Эффектов миелопептидов на спонтанную ЛХЗЛ в лейкоцитарной взвеси не обнаружено. В условиях предварительной обработки лейкоцитов миелопептидами динамика спонтанной ЛХЗЛ лейкоцитов не изменяется, в активированных зимозаном в концентрации 150 мкг/мл культурах продукция активных форм кислорода под воздействием миелопептидов выражено ингибируется с 15-й по 60-ю мин реакции, а в культурах с концентрацией зимозана 1500 мкг/мл — на 50-й и 60-й мин реакции.

В культурах клеток цельной крови при одномоментном внесении миелопептидов и зимозана все исследуемые миелопептиды оказывают стимулирующий эффект на спонтанную продукцию IL-1 β (рис. 3 и 4). В стимулированных зимозаном культурах действие миелопептидов зависит от концентрации индуктора. Обращает на себя внимание тот факт, что пик продукции IL-1 β наблюдается в культурах с максимальной концентрацией зимозана, в то время как пик индукции TNF- α зарегистрирован в присутствии более низкой концентрации индуктора. При стимуляции культур зимозаном в концентрации 150 мкг/мл эффектов пептидов на секрецию IL-1 β не выявлено, однако в культурах с концентрацией зимозана 1500 мкг/мл все исследуемые пептиды угнетают продукцию IL-1 β . Продукция TNF- α под влиянием миелопеп-

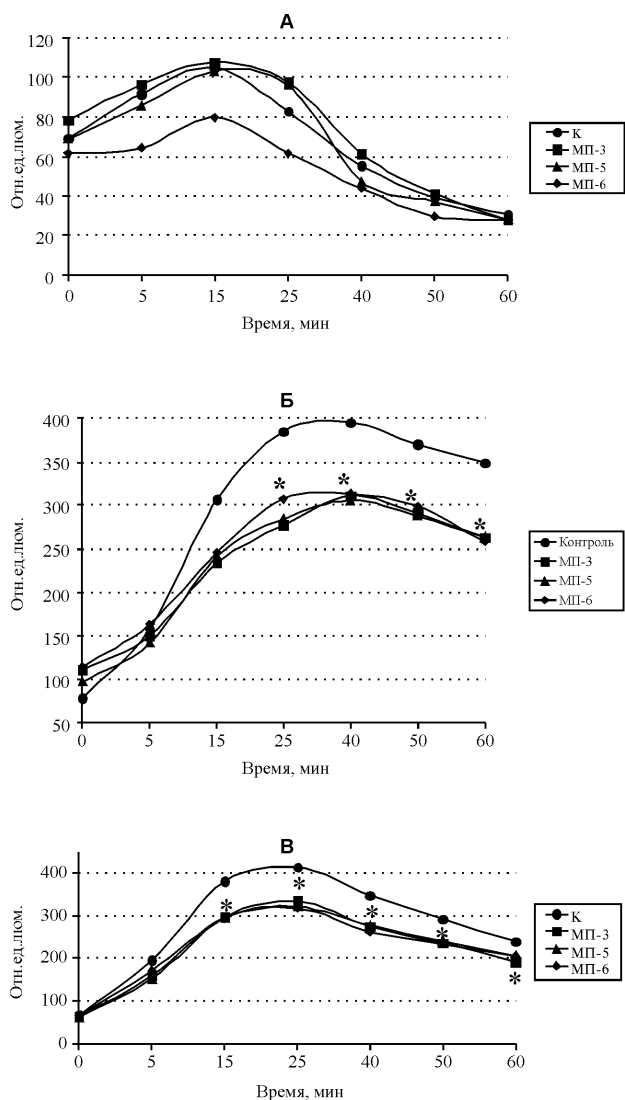


Рис. 1. Влияние миелопептидов МП-3, МП-5, МП-6 в условиях одномоментного внесения с индуктором на спонтанную (А) и зимозан-индуцированную 150 мкг/мл (Б) и 1500 мкг/мл (В) ЛЗХЛ лейкоцитов; * – $p < 0,05$ к контролю

тидов снижается в культурах с зимозаном (150 мкг/мл) и не изменяется в нестимулированных культурах, а также в присутствии зимозана в концентрации 1500 мкг/мл. В условиях предобработки миелопептиды на продукцию IL-1 β и TNF- α практически не влияют, за исключением единичного стимулирующего действия МП-5 на продукцию IL-1 β в спонтанных культурах.

Таким образом, миелопептиды МП-3, МП-5 и МП-6 угнетают продукцию активных форм кислорода и секрецию провоспалительных цитокинов активированными лейкоцитами периферической крови. Стимулирующий эффект миелопептидов был крайне слабым и проявлялся только в отношении неактивированных клеток иммунной системы при оценке продукции IL-1 β . В условиях пред-

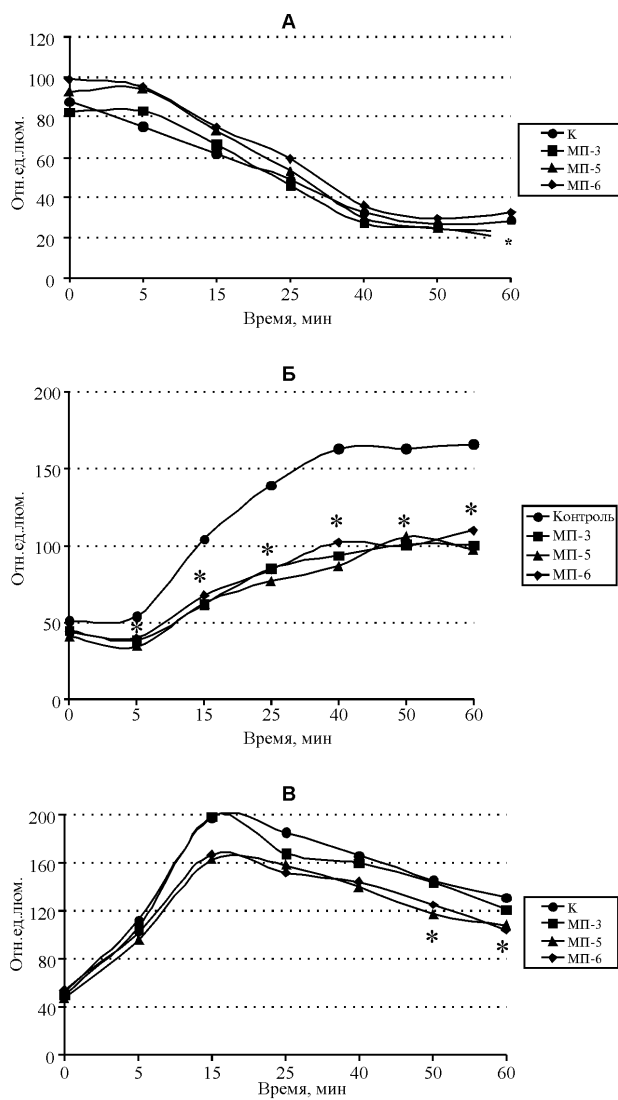


Рис. 2. Влияние миелопептидов МП-3, МП-5, МП-6 в условиях предварительной инкубации на спонтанную (А) и зимозан-индуцированную 150 мкг/мл (Б) и 1500 мкг/мл (В) ЛЗХЛ лейкоцитов; * – $p < 0,05$ к контролю

варительной обработки клеток влияние миелопептидов на продукцию активных форм кислорода было выражено в меньшей степени, в то время как на продукцию цитокинов оно отсутствовало, что свидетельствует о достижении максимального эффекта препаратов при одномоментном их внесении в культуры с зимозаном.

Ранее нами была показана способность миелопептидов угнетать ЛПС-индуцированную продукцию IL-1 β , фагоцитарную активность нейтрофилов [2] и ФГА-индуцированную пролиферацию лимфоцитов периферической крови *in vitro* [3, 4]. В то же время, в литературе есть данные о стимулирующем влиянии МП-3 на фагоцитарную активность макрофагов [1], а также об усилении в присутствии МП-3 антигенпрезентирующей спо-

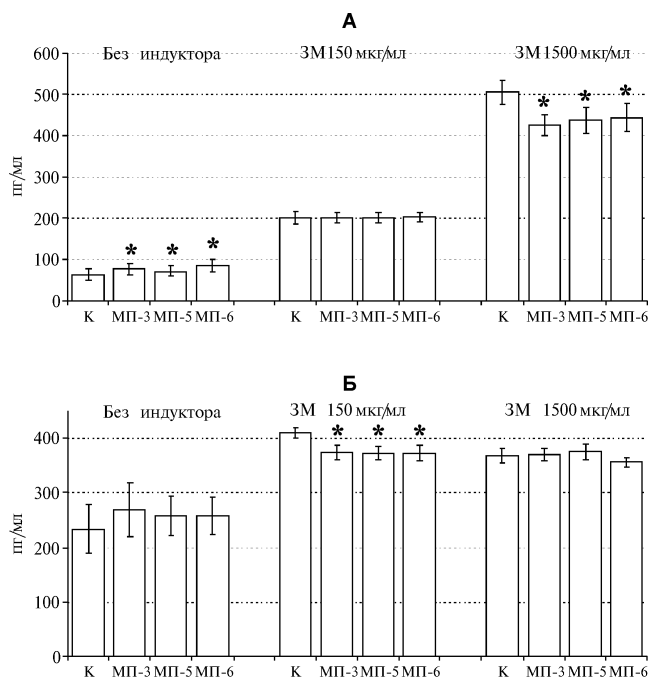


Рис. 3. Влияние миелопептидов МП-3, МП-5, МП-6 в условиях одномоментного внесения с индуктором на спонтанную и зимозан-индуцированную продукцию IL-1 β (А) и TNF- α (Б) клетками цельной крови. По оси абсцисс: К — контроль. * — $p < 0,05$ к контролю

способности незрелых дендритных клеток, увеличении их способности индуцировать созревание антигенспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов, а также усиливать устойчивость дендритных клеток к цитокин-индуцированному апоптозу [6]. При сравнительном анализе различия в направленности и выраженности эффектов различных миелопептидов выявлено не было, что предполагает наличие единого механизма действия у данной группы пептидных биорегуляторов.

Работа поддержана грантом РФФИ-Урал-а №10-04-96021 и программой Президиума УрО РАН «Фундаментальные науки — медицине».

Список литературы

1. Априкян В.С., Михайлова А.А., Петров Р.В. // Иммунология. — 2000. — №2. — С. 21—23.
2. Гаврилова Т.В., Гейн С.В. Иммуномодулирующие эффекты миелопептидов при экспериментальном проникающем ранении глаза. — Екатеринбург, 2004. — 101 с.

Сведения об авторах:

Черешнев Валерий Александрович, акад. РАН и РАМН, д-р мед. наук, дир. ИИФ УрО РАН, главн. науч. сотр. ИЭГМ УрО РАН, зав. кафедрой микробиологии и иммунологии ГБОУ ВПО ПГНИУ

Мазунина Людмила Сергеевна, аспирант ИЭГМ УрО РАН

Гаврилова Татьяна Валерьевна, д-р мед. наук, проф. зав. каф. глазных болезней ГБОУ ВПО ПГМА им. Вагнера Минздравсоцразвития России

Черешнева Маргарита Владимировна, д-р мед. наук, проф., главн. науч. сотр. ИИФ УрО РАН

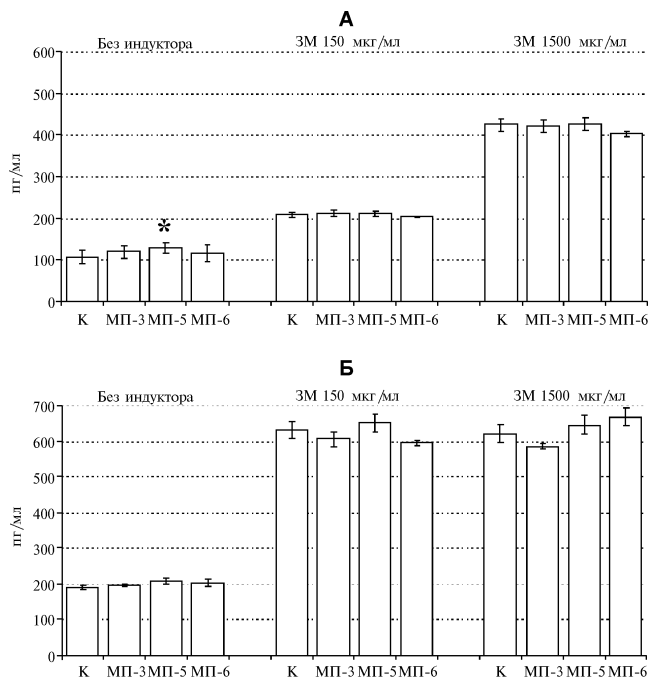


Рис. 4. Влияние миелопептидов МП-3, МП-5, МП-6 в условиях предвариантной инкубации на спонтанную и зимозан-индуцированную продукцию IL-1 β (А) и TNF- α (Б) клетками цельной крови. По оси абсцисс: К — контроль. * — $p < 0,05$ к контролю

3. Гаврилова Т.В., Гейн С.В., Погудина Т.А. и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2005. — Т. 140, №7. — С. 85—87.

4. Гейн С.В., Гаврилова Т.В., Черешнев В.А. и др. // Цитокины и воспаление. — 2008. — Т. 7, №1. — С. 24—28.

5. Петров Р.В., Михайлова А.А., Фомина Л.А. и др. Миелопептиды. — М.: Наука, 2000. — 181 с.

6. Хомякова А.В., Москалева Е.Ю., Фомина Л.А. и др. // Иммунология. — 2007. — №5. — С. 285—289.

7. Черешнева М.В., Шилов Ю.И., Черешнев В.А. и др. Иммунокоррекция в комплексном лечении больных с воспалительными заболеваниями роговой и сосудистой оболочек глаза. — Екатеринбург: УрО РАН, 2005. — 253 с.

8. Langezaal I., Coecke S., Hartung T. // Toxicol. in vitro. — 2001. — Vol. 15, №4—5. — P. 313—318.

9. Mikhailova A., Fonina L., Kirilina E. et al. // Regulatory Peptides. — 1994. — Vol. 53. — P. 203—209.

10. Pecivova J., Macickova T., Ciz M. et al. // Physiol. Res. — 2004. — Vol. 53. — P. 97—102.

Поступила 21.09.2011

А.В. Горячева¹, Л.М. Белкина¹, О.Л. Терехина¹, Г.Ф. Дауни², Р.Т. Маллет²,
Б.В. Смирин¹, Е.А. Смирнова¹, С.Ю. Машина¹, Е.Б. Манухина^{1,2}

Роль предупреждения гиперпродукции оксида азота в кардиопротекторном эффекте адаптации к периодической гипоксии

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, Балтийская ул., 8

² Центр медицинских наук Университета Северного Техаса, Форт-Уэрт, США

Адаптация к периодической нормобарической гипоксии обладает кардиопротекторным эффектом и одновременно стимулирует синтез оксида азота (NO) в организме. Однако роль NO в развитии и предупреждении ишемического и реперфузионного (ИР) повреждения миокарда противоречива. Цель работы состояла в оценке влияния адаптации к гипоксии и ИР миокарда на продукцию NO и развитие нитративного стресса в миокарде. Адаптация к гипоксии несколько увеличивала продукцию NO, которую оценивали по суммарному уровню нитритов и нитратов в плазме, и предупреждала вызванную ИР гиперпродукцию NO. Вызванная ИР гиперпродукция NO сопровождалась значительным накоплением 3-нитротирозина (3-НТ) в левом желудочке; в перегородке и в аорте накопление 3-НТ отсутствовало. Адаптация к гипоксии полностью предупреждала накопление 3-НТ при ИР, что свидетельствовало об ослаблении нитративного стресса в миокарде. Одновременно адаптация к гипоксии вызывала накопление в миокарде левого желудочка HIF-1 α . Можно предположить, что HIF-1 α вносит вклад в экспрессию NO-синтазы во время адаптации к гипоксии и тем самым способствует увеличению синтеза NO и последующему предупреждению гиперпродукции NO по механизму отрицательной обратной связи.

Ключевые слова: оксид азота, адаптация к гипоксии, нитративный стресс, ишемия и реперфузия миокарда, HIF-1 α

A.V. Goryacheva¹, L.M. Belkina¹, O.L. Terekhina¹, H.F. Downey²,
R.T. Mallet², B.V. Smirin¹, E.A. Smirnova¹, S.Yu. Mashina¹, E.B. Manukhina^{1,2}

Role of restricted nitric oxide overproduction in the cardioprotective effect of adaptation to intermittent hypoxia

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

² University of North Texas Health Science Center, 3500 Camp Bowie Blvd., Fort Worth, TX, 76107, USA

Adaptation to intermittent normobaric hypoxia is cardioprotective and can stimulate nitric oxide (NO) synthesis. However the role of nitric oxide (NO) in prevention of ischemia-reperfusion (IR) injury of myocardium is controversial. This study was focused on evaluating the effect of adaptation to hypoxia and IR on NO production and development of nitrate stress in the myocardium. Adaptation to hypoxia tended to increase NO production, which was determined by the total level of plasma nitrite and nitrate, and prevented IR-induced NO overproduction. The IR-induced NO overproduction was associated with significant 3-nitrotyrosine (3-NT) accumulation in the left ventricle but not in septum or aorta. In hypoxia-adapted rats, 3-NT after IR was similar to that of control rats without IR. IHC induced marked accumulation of HIF-1 α in the left ventricle. We suggest that HIF-1 α contributes to NO-synthase expression during adaptation to hypoxia and thereby facilitates the increase in NO production. NO, in turn, may subsequently prevent NO overproduction during IR by a negative feedback mechanism.

Key words: nitric oxide, adaptation to hypoxia, ischemia and reperfusion, 3-nitrotyrosine, HIF-1-alpha

Существует много данных о кардиопротекторном эффекте адаптации организма к умеренной периодической гипоксии [12, 19, 25, 34]. В наших экспериментах у собак и крыс периодическая нормобариче-

ская гипоксия оказывала антиаритмическое действие и существенно уменьшала площадь зоны инфаркта [1, 20]. Механизмы кардиопротекторных эффектов адаптации к гипоксии многообразны и до сих пор мало изучены. Предполагается, что важная роль может принадлежать свободным радикалам [20, 31], антиоксидантным ферментам [17], β -адренергическим механизмам [20], оксиду азота (NO) [22].

Для корреспонденции: Белкина Людмила Михайловна, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. патофизиологии кровообращения НИИОПП РАМН. E-mail: belkinal@yandex.ru

Известно, что многие защитные эффекты адаптации к гипоксии, такие, как ее антигипертензивный эффект [5] и предупреждение дисфункции эндотелия периферических и мозговых сосудов при экспериментальной гипертонии [23] и болезни Альцгеймера [6, 7] соответственно связаны со стимулирующим действием гипоксии на продукцию оксида азота (NO). Однако данные о роли NO в предупреждении ишемических и реперфузионных (ИР) повреждений миокарда при предварительной адаптации к периодической гипоксии противоречивы. В некоторых работах показано, что ингибирование синтеза NO препятствует формированию адаптационной защиты против ИР повреждения миокарда [14], и ИР повреждение усиливается у мышей, нокаутных по NO-синтазе [15, 18]. Защитные механизмы NO включают как прямые эффекты NO, такие как дилатация коронарных сосудов, так и эффекты, опосредованные индукцией синтеза протекторных белков и факторов транскрипции, например, антиоксидантных ферментов, фактора индуцируемого гипоксией (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α), белков теплового шока HSP70 и т.д. [22]. С другой стороны, имеются данные о том, что ИР повреждение связано с гиперпродукцией NO, и адаптация к гипоксии ограничивает экспрессию эндотелиальной NO-синтазы (NOS) и предупреждает увеличение уровня в плазме нитритов и нитратов во время реперфузии [28]. Это указывает на возможное ограничение реперфузионной гиперпродукции NO, в которую вносит вклад как индуцибельная NOS (iNOS), так и эндотелиальная NOS (eNOS) [33]. В пользу этого предположения свидетельствуют и данные о том, что ингибиторы NOS могут оказывать благоприятное действие при ИР повреждении [13]. В литературе также нет единого мнения о том, какое действие — защитное или повреждающее — оказывают доноры NO при ИР миокарда [22].

Цель работы состояла в оценке влияния адаптации к гипоксии и ИР миокарда на продукцию NO и нитративный стресс в миокарде и возможной роли NO в кардиопротекторном эффекте адаптации к гипоксии.

Методика

Эксперименты были выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 250—280 г. Использовались следующие группы животных:

- 1) контроль (n=18);
- 2) адаптация к гипоксии (n=16);
- 3) ИР (n=16);
- 4) адаптация к гипоксии + ИР (n=16).

Адаптацию к нормобарической гипоксии проводили в гипоксической камере циклами. Каждый цикл состоял во вдыхании гипоксической газовой смеси (9,5—10% O₂) в течение 5—10 мин, чередующимся с дыханием атмосферным воздухом в течение 4 мин. Каждый сеанс адап-

тации состоял из 5—8 циклов ежедневно. Полный курс адаптации 21 сут. Контрольные животные находились в тех же условиях, при которых проводилась адаптация к гипоксии, в течение 21 сут., но вместо гипоксической газовой смеси дышали атмосферным воздухом.

На следующий день после завершения курса адаптации к гипоксии у адаптированных и контрольных крыс проводили торакотомию под уретановым наркозом (150 мг/кг) и искусственным дыханием атмосферным воздухом (ВИТА-1, СССР). После 20-минутного периода стабилизации вызывали локальную ишемию миокарда путем перевязки нисходящей ветви левой коронарной артерии на 30 мин с последующей реперфузией в течение 60 мин. Во время ИР проводилась непрерывная регистрация ЭКГ в I отведении на установке полиграф RM-6000 (Nihon Kohden, Япония). Критерием ишемии служили цианоз передней стенки левого желудочка и подъем сегмента ST в первом отведении на ЭКГ, а реперфузии — развитии гиперемической реакции эпикарда.

Продукцию NO оценивали по суммарной концентрации стабильных метаболитов NO нитритов и нитратов в плазме. Образцы плазмы депротеинизировали путем добавления 1/20 объема ZnSO₄ (300 г/л) и центрифугировали при 3000 об./мин в течение 10 мин. Нитраты восстанавливали до нитритов в супернатанте, используя кадмиевый реактор. Аликвоту пробы смешивали с равным объемом реактива Грисса (Sigma-Aldrich, США) и инкубировали в течение 10 мин. при комнатной температуре. Суммарную концентрацию нитритов и нитратов определяли спектрофотометрически при длине волны 540 нм. Содержание маркера нитрования белков, 3-нитротирозина (3-НТ) определяли в свободной стенке левого желудочка, в перегородке сердца и аорте с помощью слот-блот анализа с использованием поликлональных антител к 3-НТ и вторых антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (Assay Designs, США). В качестве положительного контроля использовали стандарт 3-НТ (Assay Designs, США). Количественную обработку полученных иммуноблотов проводили путем сканирования и анализа оптической плотности блотов с помощью компьютерной программы Phosphor. Результаты представляли в виде репрезентативных диаграмм, как отношение площади сигнала в пикселях к интенсивности сигнала.

Экспрессию белка HIF-1 α определяли в миокарде левого желудочка с помощью Вестерн-блот анализа с использованием поликлональных антител к HIF-1 α (Santa Cruz Biotechnology, США), стандарта HIF-1 α в качестве положительного контроля и вторых антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (Santa Cruz Biotechnology, США). Обработка полученных иммуноблотов и представление данных проводились, как описано выше.

Статистическая обработка проводилась с помощью U-критерия Манна—Уитни. Данные усреднялись по группам и приводились как $M \pm SEM$. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 показано, что адаптация к гипоксии приводила к небольшому повышению уровня нитритов и нитратов в плазме ($6,8 \pm 0,5$ мкмоль/л в контроле vs $8,1 \pm 0,4$ мкмоль/л при адаптации, $p > 0,05$). Ишемия с последующей реперфузией вызывали выраженную гиперпродукцию NO: концентрация нитритов и нитратов в плазме увеличивалась с $6,8 \pm 0,5$ мкмоль/л в контроле до $14 \pm 0,9$ мкмоль/л ($p < 0,001$). Предварительная адаптация крыс к гипоксии предупредила вызванную ИР гиперпродукцию NO, в результате чего уровень нитритов и нитратов в плазме адаптированных крыс после ИР увеличился лишь до $9,1 \pm 1,1$ мкмоль/л, что было достоверно ниже, чем у неадаптированных крыс после ИР ($p < 0,005$), и достоверно не отличалось от показателя у адаптированных животных, не подвергавшихся ИР.

На рис. 2 представлены репрезентативные иммуноблоты и диаграммы, отражающие содержание 3-НТ в левом желудочке, перегородке сердца, которую использовали для сравнения как область, не затронутую ИР повреждением, и аорте. Видно, что ИР вызывала значительное накопление 3-НТ в левом желудочке ($142 \pm 8\%$ после ИР vs $100 \pm 12\%$ в контроле, $p = 0,01$), однако в перегородке и в аорте увеличения содержания 3-НТ не наблюдалось. Адаптация к гипоксии сама по себе не вызывала достоверных изменений уровня 3-НТ, но полностью предупреждала накопление 3-НТ в миокарде левого желудочка. У адаптированных к гипоксии крыс уровень 3-НТ в левом желудочке не отличался от такового у контрольных крыс без ИР повреждения. Ни в одной группе животных изменений содержания 3-НТ в перегородке или в аорте не наблюдалось.

На рис. 3 представлены репрезентативные иммуноблоты и диаграммы, отражающие содержание HIF-1 α в миокарде левого желудочка контрольных и адаптированных к гипоксии крыс. Видно, что адаптация к гипоксии вызывала выраженное накопление HIF-1 α в левом желудочке: после адаптации содержание HIF-1 α увеличилось до $220 \pm 38\%$ по сравнению с $100 \pm 7\%$ в контроле ($p < 0,005$).

Главный результат, полученный в данном исследовании, состоит том, что предварительная адаптация крыс к периодической нормобарической гипоксии в режиме, который, как ранее было показано, обладает выраженным кардиопротекторным эффектом [1, 12, 20, 34], ограничивает гиперпродукцию NO, вызванную ишемией и реперфузией миокарда. Одновременно адаптация к гипоксии

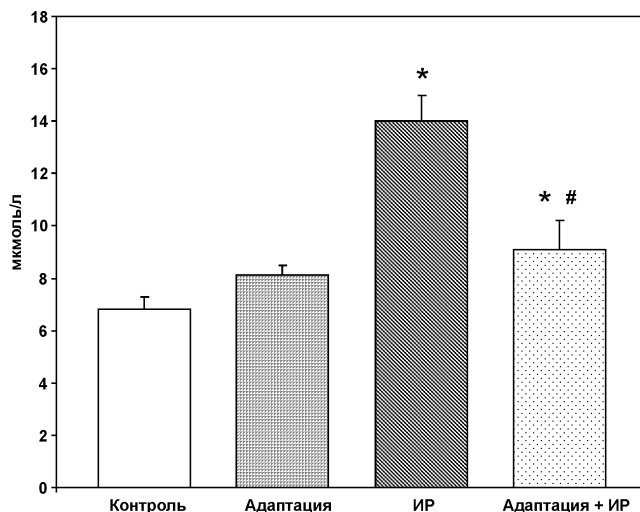


Рис. 1. Влияние адаптации к гипоксии и ишемии/реперфузии (ИР) миокарда на концентрацию нитритов и нитратов в плазме; * — $p < 0,05$ — достоверные различия от контроля; # — $p < 0,05$ — достоверные различия от ИР

предупреждала увеличение в миокарде уровня 3-НТ, который является показателем степени нитрования белков, т.е. интенсивности нитративного стресса в органе. Эти данные позволяют предположить, что одним из механизмов кардиопротекторного эффекта адаптации к нормобарической гипоксии может быть предупреждение токсических эффектов гиперпродукции NO, возникающей во время ИР повреждения сердца.

Увеличение продукции свободных форм кислорода и азота является важным патогенетическим звеном развития ИР повреждения [9]. Генерация NO в постишемическом миокарде повышается как за счет продукции NO NO-синтазой (NOS), так и за счет NOS-независимого восстановления нитрита [35]. Избыток NO реагирует с супероксиданионом, образуя высокотоксичный оксидант пероксинитрит, способный вызывать повреждения клеток и нарушения биохимических процессов за счет быстрого окисления и нитрования белков [26]. Высокие концентрации NO также могут прямо нарушать функцию кардиомиоцитов, необратимо угнетать дыхание митохондрий и даже вызывать гибель кардиомиоцитов [27].

В настоящее время существуют разногласия в отношении того, какая изоформа NOS ответственна за предупреждающую гиперпродукцию NO во время ишемии и раннего периода реперфузии миокарда. Так, показано, что у мышей, нокаутных по эндотелиальной NOS (eNOS), после ИР повреждения размер зоны инфаркта меньше, а постишемическое восстановление сократительной функции сердца лучше, чем у мышей дикого типа [15]. В то же время, специфические ингибиторы iNOS в одних исследованиях уменьшали размер инфаркта [33], а в других — увеличивали [29]. По-видимо-

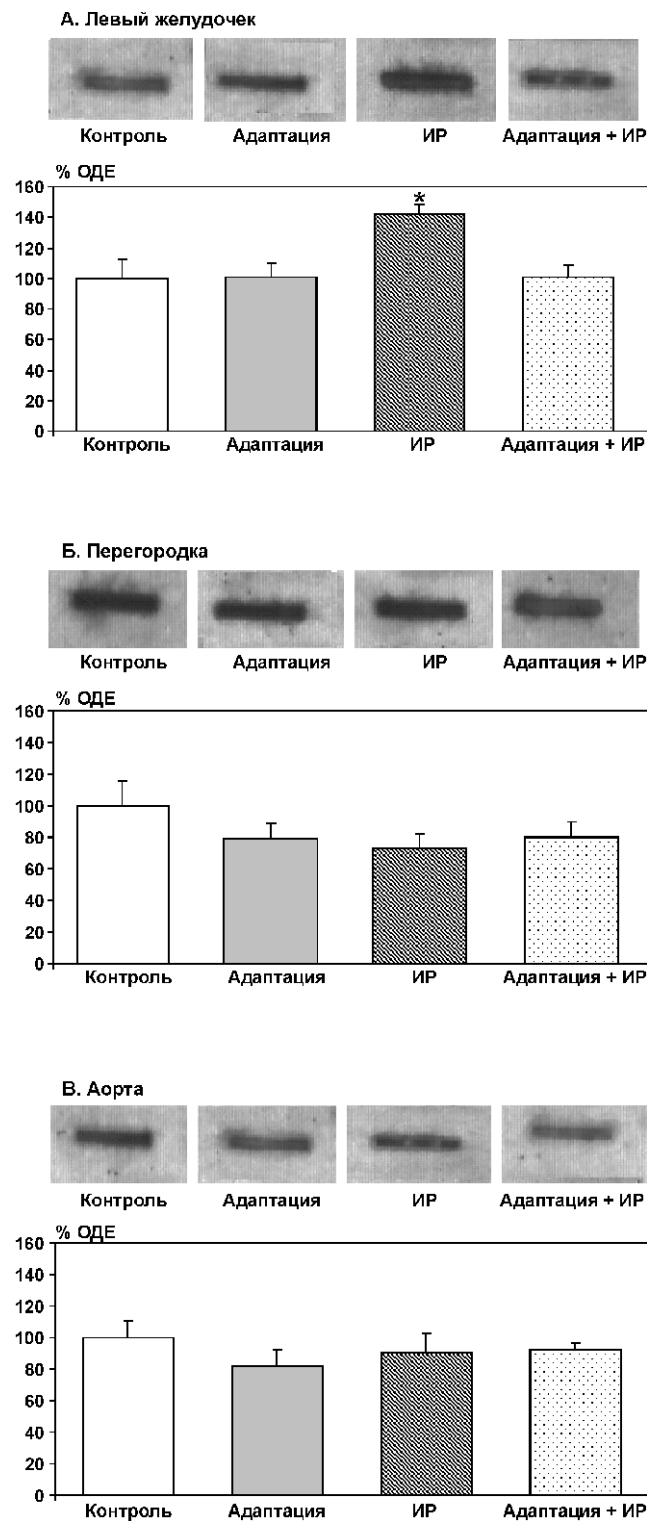


Рис. 2. Влияние адаптации к гипоксии на накопление 3-нитротирозина (3-НТ) в миокарде (А), перегородке (Б) и аорте (В) после ишемии и реперфузии (ИР) сердца. Диаграммы показывают ОДЕ (относительные денситометрические единицы) в процентах к контролю, принято за 100%; * – $p=0,01$ – достоверные различия от контроля

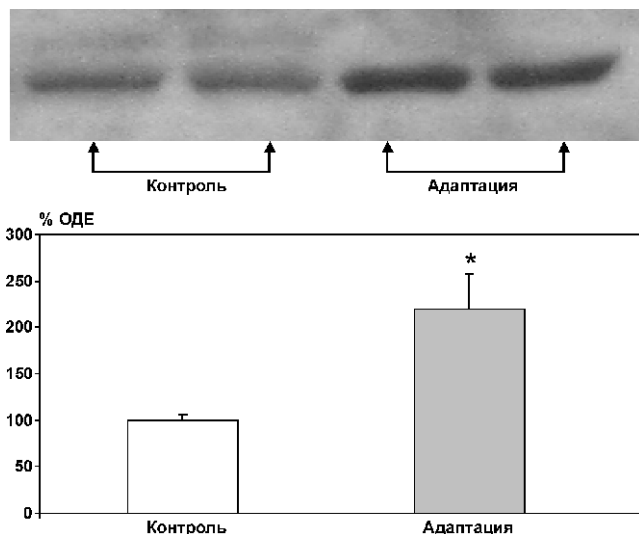


Рис. 3. Накопление HIF-1 α в миокарде левого желудочка крысы при адаптации к гипоксии. Диаграммы показывают ОДЕ в процентах контролю принятому за 100%; * – $p<0,005$ – достоверные различия от контроля

му, в раннем ИР периоде гиперпродукция NO и связанные с ней нарушения митохондриальной функции обусловлены активацией eNOS, а на поздних стадиях длительной реперфузии — индукцией iNOS, которая усугубляет повреждения [33].

Несмотря на то, что периодическая гипоксия способна сама по себе стимулировать синтез NO [22], в настоящем исследовании было показано, что адаптация к гипоксии предупреждает гиперпродукцию NO при ИР миокарда и ограничивает сопутствующий нитративный стресс в миокарде. Предыдущие исследования показали, что адаптация к периодической гипоксии оказывает аналогичный эффект в мозге. Так, адаптация предупреждала гиперпродукцию NO в ткани мозга и сопутствующие повреждения в условиях тяжелой гипоксии в барокамере при разрежении воздуха, соответствующем 11000 м [21], а также при экспериментальной болезни Альцгеймера у крыс [16]. Оказалось, что эти защитные эффекты были связаны с предварительным небольшим увеличением синтеза NO в процессе адаптации; ингибирование синтеза NO в ходе адаптации отменяло ее защитный эффект, а введение донора NO, напротив, воспроизводило его [21, 26]. Полученные в настоящей работе данные об ограничении накопления метаболитов NO в плазме и маркера нитративного повреждения 3-НТ в миокарде подтверждают предположение о том, что кардиопротекторные эффекты адаптации могут быть, по крайней мере, частично, обусловлены ограничением гиперпродукции NO. Однако причинно-следственную связь между ограничением гиперпродукции NO и кардиопротекторными эффектами адаптации к гипоксии еще предстоит доказать.

В основе предупреждения гиперпродукции NO при адаптации к гипоксии могут лежать, по меньшей мере, два механизма. Первый механизм состоит в том, что гиперпродукцию NO может прямо ограничивать NO, синтезированный во время адаптации за счет механизма отрицательной обратной связи, путем связывания NO с NOSFe²⁺, что тормозит дальнейшую продукцию NO [8]. Вторым механизмом является то, что адаптация способствует связыванию свободного NO в комплексы, образующие так называемое депо NO [24]. Депонирование NO представляет собой адаптивный механизм защиты клеток от токсических эффектов избытка NO [4, 24].

Адаптация к периодической гипоксии вызывает образование HIF-1 — гетеродимера, состоящего из кислород-чувствительной субъединицы α и конститутивной субъединицы β . Показано, что HIF-1 α играет важную роль в кардиопротекторных эффектах адаптации к периодической гипоксии при ИР повреждении, поскольку он является фактором транскрипции, опосредующим экспрессию многих генов протекторных белков, включая ген NOS [30]. В настоящей работе мы наблюдали накопление HIF-1 α в миокарде левого желудочка крыс при адаптации к гипоксии. Можно предположить, что HIF-1 α вносит вклад в экспрессию NOS во время адаптации к гипоксии и тем самым способствует увеличению синтеза NO и последующему предупреждению гиперпродукции NO по механизму отрицательной обратной связи, как уже обсуждалось выше.

Между механизмами действия NO и гипоксии имеется некоторое сходство, поскольку в условиях нормоксии NO, подобно гипоксии, может индуцировать HIF-1 α путем активации его транскрипции и трансляции [10]. Кроме того, NO прямо активирует HIF путем нитрозилирования цистеинового остатка HIF-1 α [32], а также через путь PI3K/Akt, независимо от активации растворимой гуанилатциклазы [10]. В условиях гипоксии NO препятствует накоплению HIF-1 α , его ассоциации с HIF-1 и активации генов-мишеней [11]. Сходство эффектов NO и гипоксии в отношении активации транскрипции делает понятным, почему введение крысам доноров NO [21] или активаторов NOS [2, 3] воспроизводит защитные эффекты адаптации к периодической гипоксии. Таким образом, введение экзогенного NO в условиях гипоксии может оказывать повреждающее действие, поскольку NO будет тормозить накопление HIF-1, тогда как при нормоксии NO будет оказывать защитное действие, подобное адаптации к гипоксии.

Таким образом, данные, полученные в настоящем исследовании, позволяют предположить, что в формировании кардиопротекторного эффекта адаптации к периодической гипоксии вносит вклад ограничение гиперпродукции NO и сопутствующего нитративного стресса. Этот защитный эффект наблюдается на фоне

накопления HIF-1 α в миокарде. Однако роль взаимодействия между HIF-1 α и NO в этом механизме предстоит выяснить в дальнейших исследованиях.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант №10-04-00980).

Список литературы

1. **Белкина Л.М., Смирнова Е.А., Шимкович М.В.** и др. Кардиопротекторный эффект адаптации к периодической нормобарической гипоксии у крыс // Российский кардиол. Журнал. — 2011 (в печати).
2. **Бувальцев В.И., Байда Л.А., Покидышев Д.А.** и др. Состояние эндогенной защитной системы «NO-HSP70» у генетически гипертензивных и нормотензивных крыс и возможности ее модулирования современными бета-блокаторами // Российский кардиол. журнал. — 2002а. — Т. 37 (6). — С. 72—79.
3. **Бувальцев В.И., Машина С.Ю., Покидышев Д.А.** и др. Роль коррекции метаболизма оксида азота в организме при профилактике гипертонического ремоделирования сердечно-сосудистой системы // Российский кардиол. журнал. — 2002б. — Т. 37(5). — С. 74—81.
4. **Власова М.А., Смирин Б.В., Покидышев Д.А.** и др. Механизм адаптации сосудистой системы к хроническому изменению уровня оксида азота (NO) в организме // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 2006. — Т. 142 (12). — С. 626—630.
5. **Лямина Н.П., Сенчихин В.Н., Покидышев Д.А., Манухина Е.Б.** Нарушение продукции NO у мужчин молодого возраста с артериальной гипертензией и немедикаментозный метод ее коррекции // Кардиология. — 2001. — №9. — С. 17—21.
6. **Манухина Е.Б., Пшеничкова М.Г., Горячева А.В.** и др. Роль оксида азота в предупреждении когнитивных нарушений при нейродегенеративном повреждении мозга у крыс // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 2008. — Т. 146 (10). — С. 371—375.
7. **Машина С.Ю., Александрин В.В., Горячева А.В.** и др. Адаптация к гипоксии предупреждает нарушения мозгового кровообращения при нейродегенеративном повреждении: роль оксида азота // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 2006. — Т. 142. — С. 132—135.
8. **Abu-Soud H.M., Wang J., Rousseau D.L.** et al. Neuronal nitric oxide synthase self-inactivates by forming a ferrous-nitrosyl complex during aerobic catalysis // J. Biol. Chem. — 1995. — Vol. 270. — P. 22997—23006.
9. **Berges A., Van Nassauw L., Bosmans J.** et al. Role of nitric oxide and oxidative stress in ischaemic myocardial injury and preconditioning // Acta Cardiol. — 2003. — Vol. 58. — P. 119—132.
10. **Brune B., von Knethen A., Sandau K.B.** Transcription factors p53 and HIF-1 α as targets of nitric oxide // Cell Signal. — 2001. — Vol. 13. — P. 525—533.
11. **Brune B., Zhou J.** The role of nitric oxide (NO) in stability regulation of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) // Curr. Med. Chem. — 2003. — Vol. 10. — P. 845—855.
12. **Burtscher M., Pachinger O., Ehrenbourg I.** et al. Intermittent hypoxia increases exercise tolerance in elderly men with and without coronary artery disease // Int. J. Cardiol. — 2004. — Vol. 96. — P. 247—254.
13. **Davani S., Vergely C., Royer B.** et al. Delayed 24 hours Nomega-nitro-L-arginine methyl ester injection induces pharmacological cardioprotection against reperfusion injury // Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand). — 2007. — Vol. 52 (Suppl.). — OL868—OL873.

14. *Ding H.L., Zhu H.F., Dong J.W.* et al. Inducible nitric oxide synthase contributes to intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury // *Acta Pharmacol. Sin.* — 2005. — Vol. 26. — P. 315–322.
15. *Flogel U., Decking U.K., Godecke A., Schrader J.* Contribution of NO to ischemia-reperfusion injury in the saline-perfused heart: a study in endothelial NO synthase knockout mice // *J. Mol. Cell Cardiol.* — 1999. — Vol. 31. — P. 827–836.
16. *Goryacheva A.V., Kruglov S.V., Pshennikova M.G.* et al. Adaptation to intermittent hypoxia restricts nitric oxide overproduction and prevents beta-amyloid toxicity in rat brain // *Nitric Oxide.* — 2010. — Vol. 23. — P. 289–299.
17. *Guo H.C., Zhang Z., Zhang L.N.* et al. Chronic intermittent hypobaric hypoxia protects the heart against ischemia/reperfusion injury through upregulation of antioxidant enzymes in adult guinea pigs. // *Acta Pharmacol. Sin.* — 2009. — Vol. 30. — P. 947–955.
18. *Hannan R.L., John M.C., Kouretas P.C.* et al. Deletion of endothelial nitric oxide synthase exacerbates myocardial stunning in an isolated mouse heart model // *J. Surg. Res.* — 2000. — Vol. 93. — P. 127–132.
19. *Kolar F., Ostadal B.* Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia // *Physiol. Res.* — 2004. — Vol. 53. — S3–S13.
20. *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. *Intermittent Hypoxia // From Molecular Mechanisms To Clinical Applications* / Eds. L.Xi, T.V. Serebrovskaya. — Nova Science Publishers, Hauppauge. — 2009. — P. 189–21.
21. *Malyshev I.Yu., Zenina T.A., Golubeva L.Yu.* et al. NO-dependent mechanisms of adaptation to hypoxia // *Nitric Oxide.* — 1999. — Vol. 3. — P. 105–113.
22. *Manukhina E.B., Downey H.F., Mallet R.T.* Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia // *Exp. Biol. Med.* — 2006. — Vol. 231. — P. 343–365.
23. *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. — Vol. 236. — P. 867–873.
24. *Manukhina E.B., Vanin A.F., Malyshev I.Yu.* et al. Intermittent hypoxia-induced cardio- and vasoprotection: Role of NO stores, in: L.Xi, T.V.Serebrovskaya (Eds.), *Intermittent Hypoxia: From Molecular Mechanisms To Clinical Applications* // Nova Science Publishers, Hauppauge. — 2009. — P. 113–146.
25. *Meerson F.Z.* Essentials of Adaptive Medicine: Protective Effects of Adaptation. Moscow: Hypoxia Medical LTD. — 1994.
26. *Peluffo G., Radi R.* Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. // *Cardiovasc. Res.* — 2007. — Vol. 75. — P. 291–302.
27. *Razavi H.M., Hamilton J.A., Feng Q.* Modulation of apoptosis by nitric oxide: implications in myocardial ischemia and heart failure // *Pharmacol. Ther.* — 2005. — Vol. 106. — P. 147–162.
28. *Ryou M.-G., Sun J., Oguayo K.N.* et al. Hypoxic conditioning suppresses nitric oxide production upon myocardial reperfusion // *Exp. Biol. Med.* — 2008. — Vol. 233. — P. 766–774.
29. *Sharp B.R., Jones S.P., Rimmer D.M., Lefer D.J.* Differential response to myocardial reperfusion injury in eNOS-deficient mice // *Am. J. Physiol. Heart.* — 2002. — Vol. 282. — H2422–H2426.
30. *Tekin D., Dursun A., Xi L.* Hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) and cardioprotection // *Acta Pharmacol. Sinica.* — 2010. — Vol. 31. — P. 1085–1094.
31. *Wang Z.H., Chen Y.X., Zhang C.M.* et al. Intermittent hypobaric hypoxia improves postischemic recovery of myocardial contractile function via redox signaling during early reperfusion. // *Am. J. Physiol.* — 2011. — Vol. 301. — H1695–H1705.
32. *Yasinska I.M., Sumbayev V.V.* S-Nitrosation of Cys-800 of HIF-1alpha protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity // *FEBS Lett.* — 2003. — Vol. 549. — P. 105–109.
33. *Zhao X., Chen Y.-R., He G.* et al. Endothelial nitric oxide synthase (NOS3) knockout decreases NOS2 induction, limiting hyperoxygenation and conferring protection in the postischemic heart // *Am. J. Physiol.* — 2007. — Vol. 292. — H1541–H1550.
34. *Zong P., Setty S., Sun W.* et al. Intermittent hypoxic training protects canine myocardium from infarction // *Exp. Biol. Med.* — 2004. — Vol. 229. — P. 806–812.
35. *Zweier J.L., Talukder M.A.* The role of oxidants and free radical in reperfusion injury // *Cardiovasc. Res.* — 2006. — Vol. 70. — P. 181–190.

Поступила 02.11.2011

Сведения об авторах:

Горячева Анна Владимировна, науч. сотр. лаб. регуляторных механизмов адаптации, ФГБУ НИИОПП РАМН
Терехина Ольга Леонидовна, науч. сотр. лаб. патофизиологии кровообращения, ФГБУ НИИОПП РАМН
Дауни Г.Ф., проф. отд. интегративной физиологии Центра медицинских наук Университета Северного Техаса (Department of Integrative Physiology, University of North Texas Health Science Center)

Маллет Р.Т., проф. отд. интегративной физиологии Центра медицинских наук Университета Северного Техаса (Department of Integrative Physiology, University of North Texas Health Science Center)

Смирин Борис Владимирович, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. регуляторных механизмов адаптации, ФГБУ НИИОПП РАМН

Смирнова Елена Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. патофизиологии кровообращения, ФГБУ НИИОПП РАМН

Машина Светлана Юрьевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. регуляторных механизмов адаптации ФГБУ НИИОПП РАМН

Манухина Евгения Борисовна, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. регуляторных механизмов адаптации, ФГБУ НИИОПП РАМН и адъюнкт-профессор Отдела интегративной физиологии Центра медицинских наук Университета Северного Техаса, Форт-Уэрт, США

Ш.У. Бабаярова, А.О. Охунов, А.С. Комарин

Активность NO-системы в легких после различных объемов их резекции

Ташкентская медицинская академия, Центральная научно-исследовательская лаборатория,
100109, Узбекистан, Ташкент, ул. Фароби, 2

Цель работы — оценка активности NO-системы в легких после различных объемов их резекции в эксперименте. Исследования проведены на белых крысах-самцах, которым производили левостороннюю или правостороннюю пульмонэктомию. Активность NO-системы в легких оценивали по уровню ее основных метаболитов (нитраты NO_3 и нитриты NO_2), пероксинитрита (ONOO), активности эндотелиальной (eNOS) и индуцированной (iNOS) синтаз в артериальной и венозной крови в динамике на 3-, 7- и 14-е сутки после пульмонэктомии. Выявлено, что с увеличением объема резекции легких снижается активность NO-системы. Разница показателей активности NO-системы в артериальной и венозной крови отражает состояние эндотелиальной дисфункции в легких.

Ключевые слова: оксид азота, резекция легких, пульмонэктомия, эндотелиальная дисфункция

Sh.U. Babayarova, A.O. Ohunov, A.S. Komarin

Activity of the NO-system in lung after pulmonectomy of various volumes

Tashkent Medical Academy

The study was designed to evaluate the activity of NO-system in lung after resection of various volumes. White male rats, subjected to left or right pulmonectomy, were used. Activity of the NO-system in lung was estimated as a difference in the contents of its metabolites (nitrates NO_3 and nitrites NO_2), peroxy nitrite (ONOO), activity of endothelial (eNOS) and induced enzyme (iNOS), in arterial and venous blood for 3, 7, 14 day after pulmonectomy. It was revealed, that with the increase of a resections volume, activity of NO-system was reduced. Difference in parameters of NO-system activity in arterial and venous blood reflects endothelial dysfunctions in lung, and can be used as diagnostic criterion.

Key words: nitric oxide, resection lung, pulmonectomy, endothelial dysfunction

В торакальной хирургии предметом широкой дискуссии является проблема проведения частичной или полной пульмонэктомии при ряде патологических состояний в легких [12—14]. Это обусловлено тем, что после различных объемов резекции сохраняется высокая частота послеоперационных осложнений, а летальность достигает 15—20% [5, 15]. Среди ведущих причин развития тяжелых осложнений важное место занимает нарушение гемодинамики в малом круге кровообращения. Важным механизмом нарушения гемодинамики, микроциркуляторных расстройств в легких при развитии легочной гипертензии является недостаточная продукция или ускоренное разрушение оксида азота (NO) — основного эндотелиального фактора регуляции тонуса сосудов и бронхов [2, 3]. Как недостаточная, так и избыточная продукция NO

может приводить к образованию высокореакционных, цитотоксических соединений, таких как пероксинитрит (ONOO), нитраты (NO_3) и нитриты (NO_2) [1, 4], вносящих свой вклад в развитие острого повреждения паренхимы легких, вследствие нарушения легочной гемодинамики.

В литературе практически отсутствуют сведения о состоянии метаболизма NO, активности ферментов NO-системы, уровне ONOO в легких после различных объемов их резекции. Остаются до конца не ясными как механизмы, в результате которых значимость молекулы NO меняется от защитной на повреждающую, так и роль активности ферментов NO-системы — эндотелиальной (eNOS III тип) и индуцированной NO-синтаз (iNOS II тип) [7, 8] в формировании осложнений в легких.

Цель исследования — оценка активности NO-системы в легких после различных объемов их резекции в эксперименте.

Для корреспонденции: Бабаярова Шоира Ураловна, мл. науч. сотр. ЦНИЛ ТМА. E-mail: tta2005@mail.ru

Методика

Исследования проведены на белых крысах-самцах массой 180—240 г смешанной популяции. Активность NO-системы в легких оценивали по разнице содержания NO, ONOO⁻, активности ферментов eNOS и iNOS в артериальной и венозной крови в динамике на 3-и, 7-е и 14-е сут. после проведения у животных правосторонней и левосторонней пульмонэктомии. Артериальную и венозную кровь получали из левого и правого желудочков сердца [11]. Процедуру забора проб крови объемом не более 5—6 мл осуществляли путем пункции на уровне 3-го межреберного промежутка левого и правого краев грудины, что соответствует проекции правого и левого желудочков сердца. В цельной крови определяли уровень NO по сумме основных его метаболитов NO₃⁻ и NO₂⁻ по методу П.П. Голикова с соавторами [4, 17]. Использовали реактив Griss, содержащий равные объемы 0,1% N-(1-нафтил)-этилендиамин-гидрохлорида, 1% сульфаниламида и 5% фосфорной кислоты, которые способствуют превращению NO₂ в азосоединение, имеющее максимум оптического поглощения при 546 нм на спектрофотометре СФ-46 (Россия). Активность NOS определяли по методу В.В. Сумбаева, И.М. Ясинской [9, 16] в реакционной среде, содержащей 2,5 мл 0,1 М трис-НСl буфера, рН 7,4, в состав которого входили CaCl₂ (10 мМ), 0,3 мл водного раствора L-аргинина (субстрат NOS) в концентрации 100 мкМ и 0,1 мМ НАДФН₂. Реакцию запускали внесением 0,1 мл цельной крови. Инкубацию проводили 60 мин и регистрировали убыль экстинкции при 340 нм. Нитратредуктазную активность (НР) как маркера индуцированной iNOS определяли по методу Т.П. Вавиловой, Ю.А. Петровича [2, 15]. Для этого к 0,1 мл цельной крови добавляли 0,5 мл 5 · 10⁻² М фосфатного буфера, рН 6,5. После доведения объема смеси дистиллированной водой до 2,0 мл полученную смесь инкубировали, после чего добавляли реактив Griss. Расчет проводили, используя калибровочный коэффициент 40. Содержание ONOO⁻ измеряли модифицированным спектрофотометрическим методом [1]. Уровень ONOO⁻ определяли по окислению гидроксиламина. Реакцию запускали добавлением к 0,1 мл цельной крови 0,2 мл 1,5% водного раствора гидроксиламина. Интенсивность развившейся окраски измеряли на СФ-46 при длине волны 410 нм.

Животных разделили на 3 группы: 1-я группа — животные, с правосторонней, 2-я — с левосторонней пульмонэктомией. Для всех исследуемых групп контролем служили данные, полученные на интактных животных. Каждая группа состояла из 10—12 особей.

Считается, что объем респираторной и метаболической функции легких справа у крыс выше и составляет 63%, а слева 37% от общей активности всего легкого. Поэтому после пульмонэктомии одного легкого функциональные и патофизиологические, морфологические изменения в контралатеральной части адекватно отражают те изменения, которые происходят после различных объемов резекции легких у больных людей с патологическими нарушениями в одном из легких [6, 7, 10, 11].

Результаты обрабатывали по стандартной программе с определением достоверности различий по критерию Стьюдента (t), достоверными считали различия при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

У животных интактной группы в артериальной крови содержание основных метаболитов NO, активности NOS было на 57,0 и 100% выше, чем в венозной, а концентрация ONOO⁻ и активность iNOS, напротив, были ниже соответственно в 2,6 и 3 раза. Через 3, 7 и 14 сут. после правосторонней пульмонэктомии содержание основных метаболитов NO, активность eNOS были существенно ниже, а уровень ONOO⁻ и активность НР (iNOS) выше, по сравнению с данными в контроле (таблица).

Аналогичным образом, но в меньшей степени, чем у животных 1-й группы изменялись показатели NO-системы в артериальной крови животных во 2-й группы с левосторонней пульмонэктомией. Важно отметить, что в артериальной крови содержание основных метаболитов NO, активность eNOS были существенно ниже на 19,9 и 20%, а активность НР и уровень ONOO⁻, наоборот выше на 42,8 и 36,9% через 3-е сут. после пульмонэктомии. На 7-е и 14-е сут. после пульмонэктомии у животных 1-й группы, несмотря на выраженную динамику повышения уровня основных метаболитов NO, активности eNOS, снижения уровня НР (eNOS) и содержания ONOO⁻, эти показатели все еще не достигали контрольных.

Во 2-й группе на 7-е и 14-е сут. опыта все показатели NO-системы в артериальной и венозной крови оставались на уровне контроля. Одновременно прослеживалась отчетливая параллель в изменении показателей NO-системы в крови животных 1-й и 2-й групп.

На 3, 7 и 14-е сут. после пульмонэктомии выраженные нарушения показателей NO-системы в артериальной крови ассоциируются с еще более глубокими сдвигами этой системы в венозной крови. При этом в 1-й группе в венозной крови показатели NO-системы были более значительно нарушены, чем

Динамика показателей NO-системы в артериальной и венозной крови у животных с различными объемами резекции легких, M±m

Группа	Артериальная кровь				Венозная кровь			
	NO, мкмоль/л	eNOS, мкмоль/мин/л	HP, мкмоль/мин/л	ONOO, мкмоль/л	NO, мкмоль/л	eNOS, мкмоль/мин/л	HP, мкмоль/мин/л	ONOO, мкмоль/л
1-я группа, n=12								
3-и сутки	14,52±1,180	3,42±0,132**	0,20±0,021**	1,26±0,103**	37,71±1,452* **	1,71±0,142* **	0,48±0,021* **	3,43±0,230* **
7-е сутки	17,61±1,231	3,91±0,114**	0,16±0,012**	0,99±0,052**	29,53±1,082* **	2,02±0,161* **	0,39±0,033* **	2,71±0,152* **
14-е сутки	20,35±1,770	4,53±0,163**	0,13±0,020**	0,71±0,061**	19,8±1,15	2,32±0,118* **	0,26±0,025* **	1,78±0,120* **
2-я группа, n=12								
3-и сутки	18,12±1,123	4,62±0,152**	0,14±0,014**	0,92±0,32**	23,51±1065* **	2,25±0,173* **	0,31±0,031* **	1,96±0,120*
7-е сутки	28,52±1,354	5,32±0,210	0,11±0,013	0,67±0,032	18,25±1,270*	2,67±0,154*	0,22±0,021*	1,48±0,063*
14-е сутки	26,31±1,492	6,11±0,335	0,09±0,012	0,55±0,024	16,94±1,153	3,15±0,201*	0,21±0,023*	1,50±0,081*
3-я группа контроль, n=10								
	25,51±1,350	5,63±1,201	0,10±0,011	0,60±0,021	16,41±0,830	2,82±0,182	0,23±0,012	1,51±0,041

Примечание. $p < 0,05$: * — по сравнению с данными для артериальной крови; ** — по сравнению с контролем

во 2-й группе животных. Отличительной особенностью в динамике показателей NO-системы артериальной и венозной крови после пульмонэктомии у животных 1-й и 2-й групп является то, что в артериальной крови снижение уровня основных метаболитов NO сопровождается угнетением активности eNOS и активацией HP (iNOS), а также повышением содержания ONOO, тогда как в венозной крови отмечается возрастание концентрации NO на фоне угнетения eNOS, активации HP (iNOS) и повышения уровня ONOO. В венозной крови у животных 2-й группы после 7—14 сут. пульмонэктомии показатели NO-системы оставались в пределах контрольных значений, тогда как у животных 1-й группы даже на 14-е сут. существенная разница с контролем сохранялась. Следовательно, активность NO-системы в артериальной и венозной крови животных изменяется в зависимости от объема пульмонэктомии.

В артериальной крови на фоне сниженной активности eNOS активация HP (iNOS) могла бы обеспечить высокое содержание NO, однако этого не происходит. Можно полагать, что в артериальной крови окисленный гемоглобин взаимодействует с избытком NO и снижает его возможность участвовать в реакциях образования ONOO и стимуляции активности iNOS. Вместе с тем после большого объема пульмонэктомии у животных 1-й группы насыщение гемоглобина кислородом меньше, чем во 2-й группе, что, по-видимому, было одной из причин более высокой активации фермента HP (iNOS) и содержания ONOO в артериальной крови. Подтверждением сказанному являются показатели NO-системы веноз-

ной крови у животных 1-й и 2-й групп. Насыщение гемоглобина кислородом в венозной крови меньше, чем в артериальной. Комплекс metHb с NO нестабилен, в связи с чем легко распадается. Развившаяся в ответ на пульмонэктомию, особенно правостороннюю, гипоксия способствует активации iNOS, образованию супероксидных радикалов (O_2^-) и гидроперекисей (H_2O_2), которые могут быть причиной избыточного образования NO, окислять его в нитриты (NO_2), нитраты (NO_3) и пероксинитрит ONOO [2, 3, 5].

Таким образом, в механизмах повышенного образования NO, ONOO, активации iNOS, угнетения активности фермента eNOS в венозной крови при пульмонэктомии важное место, по-видимому, занимает и реакция всего организма на гипоксию, возникающую вследствие снижения объема поступления артериальной крови в общий кровоток. Проведенные исследования показали, что в зависимости от объема пульмонэктомии отмечается значительная разница в активности NO-системы в артериальной и венозной крови, которая характеризует состояние компенсаторно-приспособительных процессов и эндотелиальную дисфункцию в сохранившихся частях легких после. Можно полагать, что чем больше объем резекции, тем выше риск развития эндотелиальной дисфункции в сохранившихся частях легкого. Полученные данные о состоянии NO-системы в легких после различных объемов их резекции позволяют с новых позиций подходить к профилактике и лечению, с учетом механизмов гемодинамических нарушений в легких и развития послеоперационных осложнений.

Список литературы

1. **Аляви А.Л., Курбанова Г.А.** Состояние обмена оксида азота при включении N-ацетилцистеина в комплексную терапию больных внебольничной пневмонией // Пробл. туб. и болезней легких. — 2007. — 9. — С. 20–24.
2. **Бродская Т.А., Невзорова В.А., Гельцер Б.И.** и др. Дисфункция эндотелия и болезни органов дыхания // Тер. арх. — 2007. — 3. — С. 76–84.
3. **Гельцер Б.И., Бродская Т.А.** Функциональное состояние сосудистого эндотелия у больных внебольничной пневмонией // Клин. мед. — 2005. — 7. — С. 19–24.
4. **Голиков П.П., Лемнев В.Л., Ахметов В.В.** и др. Характер взаимосвязи оксида азота с ангиотензинпревращающим ферментом и малоновым диальдегидом у больных с атерогенным стенозом внутренней сонной артерии // Клин. мед. — 2004. — 7. — С. 15–20.
5. **Ивашкин В.Т., Драккина О.М.** Оксид азота в регуляции функциональной активности физиологических систем // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. — 2000. — 4. — С. 16–21.
6. **Кароли А., Ребров Л.П.** Роль эндотелия в развитии легочной гипертензии у больных хроническими obstructивными заболеваниями легких // Клин. мед. — 2004. — 8. — С. 8–14.
7. **Манухина Е.Б., Дауни Х.Р., Маллет Р.Т., Малышев И.Ю.** Защитные и повреждающие эффекты периодической гипоксии: роль оксида азота // Вестн. РАМН. — 2007. — 2. — С. 25–33.
8. **Покровский В.И., Виноградов Н.А.** Оксид азота, его физиологические и патофизиологические свойства // Тер. арх. — 2005. — 1. — С. 82–87.
9. **Сумбаева В.В., Ясинская И.М.** Влияние ДДТ на активность синтазы оксида азота в печени, легких и головном мозге крыс // Соврем. пробл. токсикол. — 2000. — 3. — С. 3–7.
10. **Цой А.Н., Лазарева Н.Б.** Возможности влияния современной фармакотерапии на исход заболевания при хронической obstructивной болезни легких // Пульмонология. — 2008. — 1. — С. 110–114.
11. **Шамирзаев Н.Х., Усманов Р.Д., Назаров С.Х.** Стимуляция регенерации легких в онтогенезе // Рос. морфол. ведомости. — 2001. — 2. — С. 252–254.
12. **Шойхет Я.Н., Лепилов А.В., Бочкарев А.П.** Морфоструктурные варианты клеточно-стромальных взаимодействий в очаге деструкции при острых абсцессах и гангрене легкого в связи с процессами фибринообразования и фибриностабилизации // Пульмонология. — 2008. — 1. — С. 75–80.
13. **Canbera C., Bohr D.** The role of nitric oxide in the central control of blood pressure // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2005. — Vol. 206. — P. 77–81.
14. **Cadrillo C., Kilcoyne C.M., Quyyume A.** et al. Selective defect in nitric oxide synthesis may explain the impaired endothelium-dependent vasodilatation in essential hypertension // Circulation. — 2001. — Vol. 97. — P. 851–956.
15. **Clini E., Bianchi L., Foglio K.** et al. Effect of pulmonary rehabilitation on exhaled nitric oxide in patients with chronic obstructive pulmonary disease // Thorax. — 2001. — Vol. 56. — P. 519–523.
16. **Dzau V.J.** Angiotensin-converting enzyme as a multi-mechanistic factor in CAD // J. Myocardial. Ischemia. — 2005. — Vol. 7. — P. 6–14.
17. **Robert M.F., Pharm D., Francesco C., Ton J. Rabelink.** Atherosclerosis and the two facts of endothelial nitric oxide synthase // Circulation. — 2000. — Vol. 97. — P. 108–112.

Поступила 27.12.2010

Сведения об авторах:

Охунов Алишер Орифович, д-р мед. наук, проф. дир. ЦНИЛ ТМА

Комарин Александр Сергеевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., рук. отд. молекулярно-клеточных технологий и экспериментальной терапии ЦНИЛ ТМА

А.Н. Орехов^{1,2}, И.А. Собенин², В.А. Орехова¹, А.А. Мельниченко¹, В.А. Мясоедова^{1,2},
Н.М. Мухамедова¹, Д.М. Мартиросян¹, А.В. Пшежецкий¹, В.П. Карагодин¹

Клеточные тест-системы для выявления антиатеросклеротической активности фармакологических веществ и изучения механизмов их действия

¹ Инновационный центр Сколково,

Автономная некоммерческая организация «Научно-исследовательский институт атеросклероза Российской Академии естественных наук»,
121355, Москва, ул. Ивана Франко, 4, корп. 1

² Федеральное государственное бюджетное учреждение НИИ Общей патологии и патофизиологии РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Разработаны клеточные модели, позволяющие оценивать отток холестерина из сосудистой стенки как интегральный показатель обратного транспорта холестерина. Полученные данные могут использоваться для создания новых антиатеросклеротических лекарственных средств и для изучения механизмов их действия

Ключевые слова: холестерин, атеросклероз, клеточные модели, антиатеросклеротические средства

A.N. Orekhov^{1,2}, I.A. Sobenin², V.A. Orekhova¹, A.A. Melnichenko¹, V.A. Myasoedova^{1,2},
N.M. Muhamedova¹, D.M. Martirosyan¹, A.V. Pchejetski¹, V.P. Karagodin¹

Cultured cell systems for revelation of new drugs antiatherosclerotic effects and their mechanisms investigation

¹ Skolkovo Innovations Centre, Institute for Atherosclerosis Research, Russian Academy of Natural Sciences,
4-1, Ivana Franko str., Moscow, 121355, Russia

² The Institute for General Pathology and Pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

Cultured cell models have been developed to study the cholesterol efflux from the arterial wall as an integral indicator of reverse cholesterol transport. The models and the results of in vivo and ex vivo experiments can be used to propose new antiatherosclerotic drugs and elucidate their mood of action.

Key words: cholesterol, atherosclerosis, cultured cell models, antiatherosclerotic drugs

Причины возникновения и механизмы развития атеросклероза изучены пока недостаточно. На молекулярно-клеточном уровне ключевым моментом в атерогенезе является накопление внутриклеточных липидов, обусловленное наличием модифицированных ЛНП. В этом случае патогенетический подход к профилактике и лечению атеросклероза определяется возможностью устранения физической причины патологии, а именно, предотвращения накопления внутриклеточных липидов. Существует ряд возможностей для воздействия на этот процесс, а именно: устранение модифицированных ЛНП из кровотока, подавление процессов модификации нативных ЛНП, активация внутриклеточного метаболизма липидов, подавление захвата модифицированных ЛНП клетками, удаление накопленных липидов из клеток. Инте-

ральной оценкой эффективности различных антиатеросклеротических воздействий являются снижение скорости накопления внутриклеточных липидов и уменьшение внутриклеточного пула эфиров холестерина.

В настоящее время не существует лекарственных средств, в полной мере обладающих прямым антиатеросклеротическим действием. Известно, что регулярный прием различных препаратов может сказываться на процессах накопления холестерина в клетках артериальной стенки [3]. Ряд лекарственных препаратов различных химических групп может способствовать снижению атерогенного потенциала сыворотки крови больных атеросклерозом. Понятие «атерогенный потенциал» («атерогенность») с точки зрения клеточной биологии означает способность сыворотки крови или ее компонентов вызывать накопление эфиров холестерина в клетках, культивируемых из непораженной атеросклерозом интимы аорты человека. Сыворотка крови здоровых лиц, в отличие от сыворотки крови больных атеросклерозом, не

Для корреспонденции: Собенин Игорь Александрович,
д-р мед. наук, вед. научн. сотр., ФГБУ НИИОПП РАМН,
НИИ атеросклероза РАЕН. E-mail: sobenin@cardio.ru

обладает атерогенными свойствами. Клеточный культуральный тест представляется наиболее оптимальным и адекватным способом моделирования ранних процессов атерогенеза на клеточном уровне. С использованием клеточного теста была предложена модель «*ex vivo*» для оценки антиатерогенного потенциала лекарств. Подобный подход сделал возможным проведение серийных испытаний, необходимых для потокового скрининга лекарственных средств, обладающих антиатерогенным эффектом, а также эпидемиологических и проспективных исследований, в которых, как правило, обследуются значительные контингенты больных.

Отток холестерина, являющийся составной частью механизма обратного транспорта холестерина в организме — это обратная сторона накопления холестерина в интимальных клетках. Именно накопление внутриклеточного холестерина и его отток определяют, произойдет ли ретенция (удержание) холестерина в сосудистой стенке. Стимуляция оттока холестерина не менее важна для устранения риска развития атеросклероза, чем предотвращение накопления внутриклеточного холестерина. На клеточном уровне отток холестерина — это проявление регрессии атеросклероза.

Цель исследования — разработка клеточных моделей для поиска фармакологических веществ прямого патогенетического антиатеросклеротического действия, основанного на оттоке холестерина из клеток сосудистой стенки.

Методика

Первичная культура

субэндотелиальных клеток аорты человека

Выделение и культивирование клеток производили из грудного отдела аорт мужчин и женщин в возрасте 40—65 лет в течение 1,5—3 ч после внезапной смерти. Причиной смерти в подавляющем большинстве случаев была острая сердечно-сосудистая недостаточность. Субэндотелиальные клетки выделяли из различных участков интимы аорты, различавшихся по степени атеросклеротического поражения, путем обработки коллагеназой и культивировали в соответствии с методом Орехова с соавторами [10—12, 18]. Обработку аутопсийного материала проводили в стерильных условиях. После механического удаления адвентиции аорту рассекали вдоль и промывали в среде 199, содержащей по 100 ед/мл пенициллина и стрептомицина и 2,5 мкг/мл фунгициона. Из лоскута аорты вырезали участки, не пораженные атеросклерозом, а также участки, соответствующие жировой полосе или липофиброзной бляшке, в соответствии с классификацией Stary [15—17]. Затем с помощью пинцетов интиму отделяли от меди, при этом разделение слоев происходило по внутренней пограничной эластической мембране [12].

Для экспериментов использовали 7—10-дневную первичную культуру клеток. Такая культура представляет собой смешанную клеточную популяцию, состоящую преимущественно из типичных и модифицированных гладкомышечных клеток [1, 2, 12]. Клетки, полученные из непораженных и пораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека, культивировали отдельно и использовали в экспериментах различных типов, что позволяло в дальнейшем использовать две клеточные модели, различающиеся по своим свойствам. Первичную культуру клеток, выделенных из непораженных атеросклерозом участков интимы аорты, использовали для воспроизведения процессов атерогенеза на клеточном уровне и оценки антиатерогенных свойств исследуемых веществ. Антиатерогенным действием называли эффекты, препятствующие основным проявлениям атерогенеза на клеточном уровне, и, прежде всего, накоплению внутриклеточного холестерина. Первичную культуру клеток, выделенных из пораженных атеросклерозом участков интимы аорты, использовали для оценки антиатерогенных свойств исследуемых веществ. Антиатеросклеротическим действием называли эффекты, проявляющиеся в уменьшении содержания внутриклеточного холестерина по сравнению с исходным уровнем.

Культура моноцитов-макрофагов крови человека

Моноциты выделяли из крови здоровых добровольцев и культивировали до их созревания в макрофаги [4, 5]. Полученную чистую культуру моноцитов культивировали в CO₂-инкубаторе (5% CO₂ и 95% атмосферного воздуха) при 100% влажности и 37°C в течение 14 сут. до превращения их в макрофаги [19]. Смену инкубационной среды проводили каждые 48 ч. В экспериментах использовали культуру на 14-е сут. культивирования. Полученную таким образом культуру моноцитов-макрофагов крови человека использовали в клинических исследованиях при серийных измерениях атерогенных свойств сыворотки крови (ее способности вызывать накопление внутриклеточного холестерина).

Культивирование клеток

с исследуемыми сыворотками крови человека

В день эксперимента культуральную среду заменяли на бессывороточную среду 199, содержащую по 100 ед/мл пенициллина и стрептомицина, 2,5 мкг/мл фунгициона и 2 мМ L-глутамина, и к ней добавляли исследуемую сыворотку крови в конечной концентрации 40% (при использовании первичной культуры субэндотелиальных клеток непораженной интимы аорты человека) или 10% (при использовании культуры моноцитов-макрофагов крови человека). В качестве контроля использовали клетки, которые продолжали культивировать в среде 199, содержащей

антибиотики и 10% эмбриональную телячью сыворотку, которая содержит необходимые факторы роста клеток, но не влияет на содержание внутриклеточных липидов [13]. По окончании инкубации культуры тщательно отмывали от культуральной среды дважды 0,15 М изотоническим фосфатным буфером (ФИБ) (рН=7,35), затем дважды ФИБ, содержащим 0,2% бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma Chemical Company, США), и еще трижды ФИБ.

*Определение содержания
внутриклеточного холестерина*

По окончании инкубации липиды из клеток экстрагировали трижды смесью п-гексана и изопропанола в объемном отношении 3:2 по методу Nara и Radin [6], каждая экстракция продолжалась по 30 мин. Содержание эстерифицированного внутриклеточного холестерина определяли по разнице уровней общего и свободного холестерина.

*Определение внутриклеточных липидов
методом тонкослойной хроматографии*

Липиды из клеток экстрагировали трижды смесью п-гексана и изопропанола в объемном отношении 3:2 по методу Nara и Radin [6], каждая экстракция продолжалась по 30 мин. Нейтральные липиды разделяли методом тонкослойной хроматографии на силикагеле Kieselgel 60 (E. Merck, Германия) в двух последовательных системах:

- а) бензол — диэтиловый эфир — этанол — уксусная кислота в объемном соотношении 50:40:2:0,2;
- б) п-гексан — диэтиловый эфир — уксусная кислота в объемном соотношении 90:10:1.

Фосфолипиды хроматографировали в системе метилацетат — п-пропанол — хлороформ — метанол — 0,25% KCl в объемном соотношении 25:25:25:10:9.

Определение клеточного белка

Фиксированные на пластике клетки после экстракции липидов растворяли в 50 мкл 0,2 н. NaOH при комнатной температуре в течение 12—16 ч, после чего определяли содержание клеточного белка в каждой пробе по методу Lowry et al. [9].

*Расчет атерогенного эффекта
(оценка атерогенности сыворотки крови)*

После определения содержания общего холестерина и белка вычисляли соотношение холестерин/белок в каждой пробе. Удельное содержание общего холестерина в клетках, выделенных из непораженных участков интимы аорты, колебалось в пределах 20—50 мкг/мг клеточного белка. Удельное содержание общего холестерина в моноцитах-макрофагах

крови человека колебалось в пределах 8—20 мкг/мг клеточного белка. Среднее удельное содержание холестерина в контрольных клетках данной серии принималось за 100%, размах варьирования не превышал 8%. Атерогенный эффект исследуемых сывороток определяли по содержанию холестерина в опытных культурах и выражали в процентах от содержания внутриклеточного холестерина в контроле. Сыворотка крови пациента, вызывавшая статистически значимое накопление внутриклеточного холестерина, рассматривалась как атерогенная.

*Оценка оттока холестерина
(антиатеросклеротического эффекта)
в модели in vitro*

Для изучения антиатеросклеротического действия исследуемых веществ использовали первичную культуру субэндотелиальных клеток из пораженных атеросклеротическим процессом участков интимы аорты человека. Удельное содержание общего холестерина в таких клетках обычно составляло 50—200 мкг/мг клеточного белка. В инкубационную среду добавляли исследуемое вещество в различных концентрациях. Обычно использовали логарифмический диапазон концентраций исследуемого вещества. Инкубацию, экстракцию липидов из клеток, определение клеточного белка и измерение удельного содержания общего холестерина проводили, как описано выше. Содержание внутриклеточного холестерина в контрольных клетках, инкубированных без добавления исследуемого вещества, принимали за 100%. Эффект на отток холестерина (антиатеросклеротический эффект) исследуемых веществ определяли как их способность статистически значимо снижать исходно высокое содержание внутриклеточного холестерина.

*Оценка оттока холестерина
(антиатеросклеротического эффекта)
в модели ex vivo*

Исследования соответствовали требованиям, предъявляемым стандартом качественных клинических испытаний (Good Clinical Practice, GCP) к исследованиям фазы I и II. У добровольцев брали кровь непосредственно перед приемом исследуемого вещества, а также через соответствующие интервалы времени после его приема внутрь (обычно через 2, 4 и 6 ч при скрининговых исследованиях и при оценке краткосрочного действия, а также через 4, 8, 12 и 24 ч при оценке длительности эффекта). Эффект на отток холестерина (антиатеросклеротический эффект) исследуемых веществ в модели ex vivo определяли как их способность статистически достоверно снижать содержание холестерина в культивируемых атеросклеротических клетках.

Определение пролиферативной активности

Клетки, выделенные из нормальных или пораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека, инкубировали в течение 24 ч в присутствии 10 мкКи/мл [³H]-тимидина. По окончании инкубации липиды из клеток экстрагировали, как описано выше, а фиксированные на пластике клетки растворяли в 50 мкл 0,2 н. NaOH при комнатной температуре в течение 12—16 ч. После растворения радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике 1215 Rackbeta II (LKB, Швеция).

Определение синтеза коллагена

Клетки, выделенные из нормальных или пораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека, инкубировали в течение 24 ч в присутствии 5 мкКи/мл [³H]-пролина. По окончании инкубации включение меченого пролина в обработанную коллагенозой фракцию культуральной среды определяли по методу Peterkofsky и Diegelmann [14].

Статистическая обработка данных

Статистическую оценку достоверности различий проводили с использованием пакета SPSS версии 12.0 (SPSS Inc., США). Графическую обработку данных проводили с использованием пакета SigmaPlot версии 7.0 (SPSS Inc., США). Достоверными считали различия при 95% вероятности безошибочного прогноза.

Для оценки связи клинико-биохимических показателей и их изменений использовали корреляционный анализ по Пирсону с поправкой Бонферрони и регрессионный анализ. В окончательном виде данные для непрерывных величин представляли в виде среднего арифметического значения с указанием стандартной ошибки.

Результаты и обсуждение*Испытание фармакологических веществ на разработанных моделях*

Разработанная клеточная модель в варианте *in vitro* была использована для оценки влияния на отток холестерина гиполипидемических препаратов, используемых для снижения уровня холестерина в крови, относящихся к различным классам фармакологических веществ. Среди них был ловастатин, относящийся к классу статинов, а также липостабил, содержащий липиды натурального происхождения. Были также испытаны ингибиторы ацил-КоА-холестерина-ацилтрансферазы (АХАТ) — фермента, принимающего участие в накоплении холестерина в клетках сосудистой стенки. Было обнаружено, что только липостабил достоверно снижал содержание холестерина в клетках, культивируемых из участков атеросклеротического поражения аорты человека, т.е. вызывал обратный транспорт холестерина (табл. 1). Ни статины, ни ингибиторы АХАТ не способствовали обратному транспорту. Полученные данные являются ярким примером того, что снижение холестерина в крови не обязательно сопровождается снижением холестерина в сосудистой стенке. Так, сильное гиполипидемическое лекарственное средство ловастатин, снижающее уровень холестерина в крови путем подавления его синтеза, не способствовал обратному транспорту холестерина из атеросклеротических клеток. С другой стороны, липостабил, обладающий умеренным гиполипидемическим действием, обладал выраженным эффектом на отток холестерина. Экстраполируя этот эффект липостабила на ситуацию в организме, можно предполагать, что липостабил обладает антиатеросклеротическим действием, вызывая регрессию атеросклеротических изменений в сосуде.

Таблица 1

Влияние липостабила, ловастатина и ингибиторов ацил-КоА-холестерина-ацилтрансферазы (АХАТ) на содержание холестерина в атеросклеротических клетках интимы аорты человека *in vitro*

Препарат	Содержание внутриклеточного холестерина, мкг/мг клеточного белка
Контроль	105±11
Липостабил	82±3*
Ловастатин	110±10
CI-976	98±8
CL-277082	107±10
DuP-128	97±6

Примечания. Клетки из пораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека выделяли и культивировали, как описано в разделе «Методы».

Влияние веществ на содержание внутриклеточного холестерина изучали в концентрации 10⁻⁶ М.

Данные представляют средние значения, полученные в трех независимых экспериментах.

* — достоверное снижение содержания внутриклеточного холестерина, p<0,05

В табл. 2 приведены данные комплексной оценки влияния на атеросклеротические показатели культивируемых клеток известного лекарственного средства верапамила, относящегося к классу антагонистов кальция. Известно, что верапамил обладает антиатеросклеротическим действием, вызывая регрессию атеросклероза у больных с документированными атеросклеротическими поражениями сосудов [7]. В первичной культуре интимальных клеток аорты человека верапамил дозозависимо снижал содержание общего холестерина, т.е. способствовал обратному транспорту холестерина. В отсутствие верапамила отток холестерина из клеток не наблюдался. При этом свободный (неэтерифицированный) холестерин не изменялся. Это свидетельствует о том, что снижение содержания холестерина в клетках происходит исключительно за счет эфиров холестерина. Наряду со снижением общего холестерина наблюдалось уменьшение содержания двух других важнейших классов внутриклеточных липидов — фосфолипидов и триглицеридов. Таким образом, обратный транспорт холесте-

на из атеросклеротических клеток сопровождается снижением внутриклеточного содержания других важнейших классов липидов, что должно способствовать освобождению клеток атеросклеротического поражения от избыточного жира. Такая регрессия клеточного липидоза может объяснять механизм антиатеросклеротического действия верапамила.

Верапамил вызывал дозозависимое существенное подавление пролиферативной активности культивируемых атеросклеротических клеток. Кроме того, верапамил подавлял синтез коллагена в первичной культуре клеток, выделенных из очагов атеросклеротического поражения (табл. 2).

Таким образом, верапамил не только способствует оттоку холестерина из атеросклеротических клеток, но обладает и другими антиатеросклеротическими эффектами на уровне клеток сосудистой стенки, подавляя пролиферативную и синтетическую активность, т.е. уменьшает или подавляет все основные проявления атеросклероза на клеточном уровне — липоидоз, пролиферацию и фиброз.

Таблица 2

Антиатеросклеротические эффекты верапамила в модели *in vitro*

Исследуемый параметр	Концентрация верапамила, М	Эффект верапамила, % от контроля
Общий холестерин	10^{-7}	104±5
	10^{-6}	82±8 (p<0,05)
	10^{-5}	61±4 (p<0,01)
Свободный холестерин	$5 \cdot 10^{-5}$	90±8
Фосфолипиды	$5 \cdot 10^{-5}$	61±8 (p<0,05)
Триглицериды	$5 \cdot 10^{-5}$	76±2 (p<0,05)
Включение [³ H]-тимидина	10^{-7}	86±7
	10^{-6}	50±2 (p<0,01)
	10^{-5}	34±2 (p<0,001)
	10^{-4}	20±2 (p<0,001)
Синтез коллагена	$5 \cdot 10^{-5}$	74±5 (p<0,05)

Примечания.

1. Контрольные уровни в контроле составили 12,2±0,2 dpm/мкг клеточного белка для включения меченого тимидина; 57,4±1,2, 71,4±10,9, 46,8±5,3, 12,1±1,7, 30,8±1,6 мкг/10⁵ клеток для общего холестерина, фосфолипидов, свободного холестерина, триглицеридов и эфиров холестерина, соответственно; 2500±102 dpm/10³ клеток для включения меченого пролина;

2. Достоверность отличий от контроля указана в таблице.

Таблица 3

Антиатеросклеротическое действие верапамила в модели *ex vivo*

Время после приема верапамила, ч	Содержание внутриклеточного холестерина, % от контроля
0	104±3
1	91±11
2	55±10 *
4	44±4 *
8	46±3 *
12	59±6 *

Примечание. Контрольные клетки, выделенные из очагов атеросклеротического поражения, содержали 221±13 мкг холестерина на 1 мг клеточного белка; этот уровень принят за 100%; * — достоверное снижение уровня внутриклеточного холестерина, p<0,05

Влияние верапамила на отток холестерина, выявленный на модели *in vitro*, был подтвержден на модели *ex vivo*. В табл. 3 приведены данные, полученные на разработанной модели *ex vivo*. Добровольцы однократно принимали верапамил в дозе 40 мг. Кровь брали до приема верапамила (время «0») и через 1, 2, 4 и 8 ч после приема. Из образцов крови готовили сыворотку, и образцы сыворотки добавляли в первичную культуру атеросклеротических клеток. Можно видеть, что значимое снижение содержания внутриклеточного холестерина наблюдалось в случае добавления в культуру сыворотки, приготовленной из крови, взятой спустя 2 ч после однократного приема верапамила (табл. 3). Таким же эффектом обладали сыворотки, взятые через 4, 8 и 12 ч после приема верапамила. Следовательно, начиная с 2 ч после однократного приема верапамила сыворотка крови приобретает антиатеросклеротические свойства, проявляющиеся в способствовании обратному оттоку холестерина из атеросклеротических клеток. Антиатеросклеротические свойства сыворотки сохраняются, по крайней мере, в течение 12 ч после приема. На разработанных клеточных моделях оттока холестерина в вариантах *in vitro* и *ex vivo* были испытаны различные фармакологические вещества. На модели *in vitro* сравнивали описанные выше эффекты верапамила с эффектами других лекарственных средств.

В дополнение к верапамилу были испытаны другие антагонисты кальция, в частности: нифедипин, дилтиазем, никардипин, циннаризин, папаверин. Кроме того, на разработанной клеточной модели *in vitro* были испытаны бета-блокаторы и нитраты, которые, наряду с антагонистами кальция, являются наиболее широко используемыми классами антиангинальных препаратов.

Все исследованные антагонисты кальция способствовали оттоку холестерина из атеросклеротических клеток *in vitro* в разработанной модели, вызывая значимое снижение содержания внутриклеточного холестерина в культивируемых клетках атеросклеротического поражения аорты человека (табл. 4). Помимо этого, все антагонисты кальция подавляли пролиферативную активность атеросклеротических клеток (табл. 4). Таким образом, можно говорить о наличии у антагонистов кальция антиатеросклеротических эффектов, проявляемых на уровне клеток сосудистой стенки.

Напротив, все исследованные бета-блокаторы не только не способствовали оттоку холестерина из атеросклеротических клеток *in vitro*, но и повышали содержание холестерина в них. Параллельно все бета-блокаторы стимулировали пролиферативную активность культивируемых атеросклеротических клеток (табл. 4). Таким образом, бета-блокаторы проявляют прямые проатерогенные эффекты на уровне артериальных клеток.

Таблица 4

Влияние антагонистов кальция, бета-блокаторов и нитратов на содержание холестерина и пролиферативную активность клеток, выделенных из очагов атеросклеротического поражения

Препарат	Концентрация, М	Содержание внутриклеточного холестерина, % от контроля	Включение [³ H]-тимидина, % от контроля
Антагонисты кальция			
Верапамил	10 ⁻⁶ — 10 ⁻⁴	29±7 — 69±6 *	33±4 — 65±13 *
Нифедипин	10 ⁻⁶ — 10 ⁻⁴	48±4 — 79±4 *	37±7 — 54±5 *
Дилтиазем	10 ⁻⁵ — 10 ⁻⁴	61±7 — 71±8 *	49±7 — 70±6 *
Никардипин	10 ⁻⁵ — 10 ⁻⁴	68±4 — 74±5 *	56±4 — 70±5 *
Циннаризин	10 ⁻⁶ — 10 ⁻⁴	84±9 — 99±5	47±7 — 70±5 *
Папаверин	10 ⁻⁵ — 10 ⁻⁴	64±6 — 66±4 *	51±1 — 55±6 *
Бета-блокаторы			
Пропранолол	10 ⁻⁹ — 10 ⁻⁵	118±7 — 127±8 #	169±9 — 181±20 #
Альprenолол	10 ⁻⁹ — 10 ⁻⁴	132±9 — 164±10 #	138±4 — 148±10 #
Метопролол	10 ⁻⁴	135±4 #	129±18
Пиндолол	10 ⁻⁶ — 10 ⁻⁴	132±8 — 149±17 #	143±6 — 170±12 #
Тимолол	10 ⁻⁹ — 10 ⁻⁶	130±11 — 178±9 #	140±10 — 169±18 #
Нитраты			
Нитроглицерин	10 ⁻⁹ — 10 ⁻⁴	83±7 — 116±7	96±9 — 140±21
Изосорбид	10 ⁻⁹ — 10 ⁻⁴	99±15 — 119±9	102±5 — 124±14
Нитропруссид	10 ⁻⁹ — 10 ⁻⁴	86±4 — 118±8	69±17 — 106±10

Примечание. * — достоверное снижение показателей по сравнению с контролем, p<0,05; # — достоверное повышение по сравнению с контролем, p<0,05

Третий класс антиангинальных препаратов — нитраты — не способствовал оттоку холестерина на модели *in vitro*. Нитраты не оказывали значимого влияния ни на содержание холестерина, ни на пролиферативную активность атеросклеротических клеток, т.е. они не обладали антиатерогенным действием (табл. 4).

При этом данные о прямых антиатеросклеротических эффектах антагонистов кальция, проатерогенных эффектах бета-блокаторов и выявленное отсутствие эффектов, имеющих отношение к атеросклерозу, у нитратов имеют важное самостоятельное значение для объяснения механизмов различного действия этих препаратов на развитие атеросклеротических изменений в артериальной стенке [8].

Таким образом, нами разработаны наиболее приближенные к ситуации в организме клеточные модели, позволяющие оценивать отток холестерина как интегральный показатель важнейшего проявления обратного транспорта холестерина. Полученные данные позволяют с оптимизмом рассматривать возможность применения разработанных моделей для создания новых антиатеросклеротических лекарственных средств и для изучения механизмов их действия.

Работа была поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации.

Список литературы

1. **Андреева Е.Р., Михайлова И.А., Пугач И.М., Орехов А.Н.** Клеточный состав атеросклеротических поражений аорты человека // *Ангиол. Сосуд. Хир.* — 1999. — Т. 5. — С. 6—26.
2. **Андреева Е.Р., Тертов В.В., Мухин Д.Н., Орехов А.Н.** Клеточный состав и биохимические особенности аорты человека // *Бюлл. ВКНЦ. АМН. СССР.* — 1985. — Т. 8. — С. 63—71.
3. **Ackermann R.T., Mulrow C.D., Ramirez G.** et al. Garlic shows promise for improving some cardiovascular risk factors // *Arch. Intern. Med.* — 2001. — Vol. 161. — P. 813—824.
4. **Adams D.O.** Macrophages // *Methods Enzymol.* — 1979. — Vol. 58. — P. 494—505.
5. **Edelson P.J., Kohn Z.A.** Purification and Cultivation of Monocytes and Macrophages // *In vitro methods in cell-mediated and tumor Immunity* / Bloom B.R., David J.R., eds. — Academic Press, Inc., New York. — 1976. — P. 333—340.
6. **Hara A., Radin N.S.** Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent // *Anal. Biochem.* — 1978. — Vol. 90. — P. 420—426.
7. **Hernandez R.H., Armas-Hernandez M.J., Velasco M.** et al. Calcium antagonists and atherosclerosis protection in hypertension // *Am. J. Ther.* 2003. — Vol. 10. — P. 409—414.
8. **Loaldi A., Polese A., Montorsi P.** et al. Comparison of nifedipine, propranolol and isosorbide dinitrate on angiographic progression and regression of coronary arterial narrowings in angina pectoris // *Am. J. Cardiol.* 1989. — Vol. 64. — P. 433—439.
9. **Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall B.J.** Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
10. **Orekhov A.N., Andreeva E.R., Krushinsky A.V., Smirnov V.N.** Primary cultures of enzyme-isolated cells from normal and atherosclerotic human aorta // *Med. Biol.* — 1984. — Vol. 62. — P. 255—259.
11. **Orekhov A.N., Karpova I.I., Tertov V.V.** et al. Cellular composition of atherosclerotic and uninvolved human aortic subendothelial intima. Light-microscopic study of dissociated aortic cells // *Am. J. Pathol.* — 1984. — Vol. 115. — P. 17—24.
12. **Orekhov A.N., Tertov V.V., Novikov I.D.** et al. Lipids in cells of atherosclerotic and uninvolved human aorta. I. Lipid composition of aortic tissue and enzyme-isolated and cultured cells // *Exp. Mol. Pathol.* — 1985. — Vol. 42. — P. 117—137.
13. **Orekhov A.N., Tertov V.V., Smirnov V.N.** Lipids in cells of atherosclerotic and uninvolved human aorta. II. Lipid metabolism in primary culture // *Exp. Mol. Pathol.* — 1985. — Vol. 43. — P. 187—195.
14. **Peterkofsky B., Diegelmann R.** Use of mixture of proteinase free collagenases for specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins // *Biochemistry.* — 1971. — Vol. 10. — P. 988—984.
15. **Stary H.C.** Composition and classification of human atherosclerotic lesions // *Virchows. Arch. (A).* — 1992. — Vol. 421. — P. 277—290.
16. **Stary H.C., Chandler A.B., Glagov S.** et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association // *Circulation.* — 1994. — Vol. 89. — P. 2462—2478.
17. **Stary H.C.** Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions: An Update // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2000. — Vol. 20. — P. 1177—1178.
18. **Tertov V.V., Orekhov A.N., Ryong L.H., Smirnov V.N.** Intracellular cholesterol accumulation is accompanied by enhanced proliferative activity of human aortic intimal cells // *Tissue. Cell.* — 1988. — Vol. 20. — P. 849—854.
19. **Virella G., Mudoz J.F., Galbraith G.M.P.** et al. Activation of human monocyte-derived macrophages by immune complexes containing low-density lipoprotein // *Clin. Immunol. Immunopathol.* — 1995. — Vol. 75. — P. 179—189.

Поступила 12.05.2011

Сведения об авторах:

Орехов Александр Николаевич, д-р биол. наук, зав. лаб. клеточных механизмов атерогенеза;
 Мясоедова Вероника Александровна, аспирант ФГБУ НИИОПП РАМН;
 Мартиросян Даник Михайлович, канд. мед. наук, проф. ФГБУ НИИОПП РАМН;
 Пшежецкий Алексей Валерьевич, канд. хим. наук, вед. науч. сотр. НИИ атеросклероза;
 Карагодин Василий Петрович, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. НИИ атеросклероза

Т.Г. Рукша

Модуляция апоптоза форболмиристатацетатом осуществляется независимо от уровня экспрессии TsPO в клетках плоскоклеточного рака кожи

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, 660022, г. Красноярск, ул. П. Железняк, 1

Форболовые эфиры являются модуляторами активности протеинкиназы С, которая, в свою очередь, регулирует пролиферацию, дифференцировку, апоптоз клеток кожи. Помимо этого, показано, что форболмиристатацетат обладает способностью регулировать активность промотора TsPO, внутриклеточного белка, принимающего участие в регуляции клеточной пролиферации и апоптоза. Исследовано изменение уровня каспазы-3 и TsPO в клетках плоскоклеточного рака кожи после воздействия форболмиристатацетатом и ультрафиолетовым излучением. Определены разнонаправленные эффекты модуляторов на анализируемые параметры, что может быть объяснено различными механизмами регуляции функциональной активности исследуемых белков.

Ключевые слова: апоптоз, клеточная пролиферация, плоскоклеточный рак кожи, протеинкиназа С, TsPO

T.G. Ruksha

Apoptosis modulation by PMA occurs independently of TsPO expression in squamous cell carcinoma cells

Krasnoyarsk State Medical University, 1, P. Zeleznyaka street, Krasnoyarsk, 660022, Russia

Phorbol esters are known to modulate protein kinase C activity — enzyme involved in cell proliferation, differentiation and apoptosis regulation in skin cells. Besides it phorbol-12-myristate 13-acetate was shown possible to modulate promoter activity of TsPO — protein that is involved in steroidogenesis and cell proliferation regulation. Caspase-3 and TsPO expression was measured in squamous cell carcinoma cells after incubation with phorbol-12-myristate 13-acetate and ultraviolet radiation. Following alterations of TsPO and caspase-3 levels are explained by different mechanisms of regulation.

Key words: apoptosis, cell proliferation, squamous cell carcinoma, protein kinase C, TsPO

Форболовые эфиры являются хорошо изученными опухолевыми промоторами. Они легко проникают в клетку и взаимодействуют с протеинкиназой С, вызывая ее активацию. Протеинкиназа С является ферментом класса фосфолипид-зависимых сериновых/треониновых киназ, активность которой модулируется, также различными стрессовыми факторами, включая ультрафиолетовое облучение (УФО). Протеинкиназе С, представленной в эпидермисе шестью изоформами (α , δ , ϵ , η , μ , ξ), отводят роль в регуляции роста и дифференцировки кератиноцитов. Нарушения механизмов передачи сигнала с участием протеинкиназы С играют роль в патогенезе

воспалительных заболеваний кожи, в развитии злокачественных и доброкачественных новообразований кожи [14].

Форболовые эфиры вызывают активацию «классических» изоформ протеинкиназы С (α , β , γ), и так называемых «новых» (δ , ϵ , η). Показано участие протеинкиназы С в регуляции опухолевой прогрессии и метастазирования [4]. С другой стороны, установлено, что активация протеинкиназы С связана с регуляцией синтеза стероидных гормонов [11].

Необходимо отметить, что одним из компонентов, взаимодействующих со StAR, одного из инициаторов клеточного этапа стероидогенеза, является белок TsPO (ранее известный как периферический бензодиазепиновый рецептор, ПБР). Доказано взаимодействие белков TsPO и StAR. Считается, что StAR служит гормонально-зависимым активатором стерои-

Для корреспонденции: Рукша Татьяна Геннадьевна, д-р мед. наук, зав. каф. патофизиологии с курсом клинической патофизиологии им. проф. В.В. Иванова, ГБОУ ВПО КраСГМУ им. В.Ф. Войно-Ясенецкого. E-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

догенеза, а TsPO обеспечивает транспорт холестерина через митохондриальную мембрану [5]. Помимо участия TsPO в регуляции стероидогенеза было показано изменение экспрессии TsPO в опухолевых клетках, а также модулирующий эффект лигандов данного белка в отношении интенсивности клеточной пролиферации. TsPO отводит роль в регуляции апоптоза. В частности, известно [12], что в TsPO-трансфектированных клетках происходит замедление активации каспазы-3 после воздействия УФО излучения В типа, а в коже больных псориазом уровень TsPO коррелировал с изменениями интенсивности апоптоза в прогрессирующую и регрессирующую стадии заболевания [1]. Нами также было показано, что TsPO изменяет свою конформацию при воздействии УФО, что влияет на уровень клеточной пролиферации в клетках меланомы [2].

Представленные данные литературы об эффектах протеинкиназы С на индукцию StAR-опосредованного стероидогенеза, ее роли в регуляции клеточной пролиферации и апоптоза, позволяют предположить, что функционирование TsPO, принимающего участие в реализации этих же процессов, может находиться под регуляторным контролем данного фермента.

Цель исследования — определение уровня экспрессии TsPO и каспазы-3 в клетках плоскоклеточного рака кожи после воздействия фторболмиристатацетатом (ФМА) и УФО.

Методика

Клетки плоскоклеточного рака кожи (клеточная линия A431) культивировались в среде Игла, модифицированной Дульбекко (Cellgro, Mediatech Inc.), обогащенной 10% раствором фетальной бычьей сыворотки, глутамином, пируватом натрия и глюкозой. Клетки инкубировались при 37°C в кислородной смеси с 5% содержанием CO₂. Клетки выращивались до 70—80% плотности, после чего подвергались трипсинизации с последующим пересеванием культур в чашки Петри. В дальнейшем производилась инкубация клеток с ФМА в концентрации 10 нмоль, 50 нмоль, 100 нмоль, а также часть клеток подвергалась ультрафиолетовому излучению в сочетании с инкубацией с ФМА в вышеуказанных концентрациях. УФО осуществлялось с помощью источника ультрафиолетового света с пиком длины волны в диапазоне 302 нм (модель UVM-57 San Gabriel), время облучения составляло 120 с, что соответствовало дозе 480 Дж/м². Через 24 ч производилась трипсинизация клеток, их лизис в лизирующем буфере (50 мМ Tris-HCl (pH 6,8), 100 мМ дитийотрейтол, 2% додецилсульфат натрия, 0,1% бромфеноловый синий, 15% глицерин), кипячение в течение 10 мин, после чего образец наносился в лунки 4—20% SDS-поли-

акриламидного геля по 20 мкл. В последующем белки после проведения электрофореза переносились на нитроцеллюлозную мембрану (Schleicher&Schuell). Блокирование мембраны производилось в течение 1 ч при комнатной температуре в буфере, содержащем 20 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 0,5 М NaCl и 0,05% твин-20, а также 5% раствор обезжиренного сухого молока. После этого производилась инкубация с антителами к TsPO (1:2000, Trevigen), прокаспазе-3, каспазе-3 (1:1000, Biomol International). Инкубация со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (1:5000, Transduction Laboratories, Lexington, KY) составляла 1 ч при комнатной температуре. Визуализация комплекса антиген-антитело производилась с помощью набора реагентов «ECL Western blotting detection reagents and analysis system» (Amersham Biosciences). Для подтверждения содержания равного количества белка в каждом образце, мембраны после процедуры элиминации первичных антител повторно инкубировались с анти-G3PDH моноклональными антителами (1:10000, Trevigen). Показатели экспрессии определялись как соотношение банды или полосы, соответствующей ПБР или прокаспазе-3, каспазе-3 к полосе, соответствующей G3PDH.

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью критерия Уилкоксона.

Результаты и обсуждение

Уровень экспрессии TsPO достоверно изменялся при инкубации клеток с ФМА в концентрации 100 нмоль. При этом сочетанное воздействие УФО в дозе 480 Дж/м² и ФМА в аналогичной дозе вызывало снижение уровня до контрольных показателей. Уровень прокаспазы-3 достоверно уменьшался при воздействии УФО и ФМА. Достоверных изменений уровня прокаспазы-3 при воздействии только ФМА не наблюдалось. Уменьшение уровня прокаспазы-3 свидетельствует о ее переходе в активную форму и, таким образом, указывает на развитие необратимых событий апоптоза [9]. Действительно, при инкубации клеток плоскоклеточного рака кожи с ФМА в концентрации 50 нмоль, 100 нмоль в сочетании с УФО, регистрировалось повышение уровня каспазы-3 (таблица).

Фторболовые эфиры являются промоторами плоскоклеточного рака кожи. ФМА вызывает активацию протеинкиназы С, которая является ключевым компонентом нескольких сигнальных путей, в том числе регулирующих дифференцировку и пролиферацию клеток, апоптоз, синтез стероидных гормонов. Протеинкиназа С регулирует функциональную активность StAR, который вместе с TsPO участвует в инициации ключевого этапа стероидогенеза.

Уровни экспрессии TsPO, прокаспазы-3 и каспазы-3 после инкубации с ФМА и УФО

	Контроль	10 нмоль ФМА	10 нмоль ФМА + УФО	50 нмоль ФМА	50 нмоль ФМА + УФО	100 нмоль ФМА	100 нмоль ФМА + УФО
Прокаспазы-3	0,62	0,72	0,23*	0,41	0,15*	0,31*	0,08*
Каспазы-3	0,04	0,04	0,02	0,04	0,08*	0,03	0,1*
TsPO	1,1	1,7	1,4	0,5	1,2	4,1*	1,8

Примечание. * — достоверные различия по сравнению с контролем, $\alpha=0,05$

В представленной работе было исследовано влияние ФМА на уровень каспазы-3 и на уровень фоточувствительного белка, ассоциированного с синтезом стероидных гормонов, апоптозом, канцерогенезом — TsPO. В связи с тем, что УФО оказывает модулирующий эффект на функциональную активность TsPO, в сериях экспериментов клетки подвергались сочетанному воздействию ФМА и УФО. Ранее нами было показано, что УФО в дозе 480 Дж/м² изменяет уровень экспрессии TsPO в клетках плоскоклеточного рака кожи [3]. В данном исследовании выявлено, что УФО индуцирует проапоптотическое действие ФМА. Известно, что сочетанное применение УФО и ФМА вызывало индукцию апоптоза в мышечных фибробластах [6]. Помимо этого, протеинкиназа Сδ в сочетании с воздействием УФО индуцировала апоптоз кератиноцитов [7]. Следовательно, сочетание УФО и ФМА вызывают апоптоз как опухолевых, так и нормальных клеток кожи.

С другой стороны, уровень TsPO изменялся только при инкубации клеток с ФМА в концентрации 100 нМ, в то время как ФМА в меньших концентрациях, а также при сочетании с УФО, не оказывал достоверного модулирующего эффекта на экспрессию TsPO в клетках плоскоклеточного рака кожи. Существуют данные литературы, указывающие, что в ответ на стимуляцию ФМА в концентрации 50 нМ происходит изменение уровня мРНК и белка TsPO в стероидпродуцирующих клетках, в то время как в стероиднепродуцирующих клетках достоверных изменений уровня TsPO после стимуляции ФМА обнаружено не было. Более того, было показано, что ФМА посредством активации протеинкиназы Сε индуцировал связывание транскрипционного фактора c-Jun с промотором TsPO и, таким образом, влиял на уровень экспрессии TsPO [4]. Ранее была показана роль протеинкиназы Сε в стероидогенезе: в частности, у мышей, не экспрессирующих данный фермент, было обнаружено снижение уровня кортикостерона в крови [8]. В нашем исследовании не было выявлено однонаправленной тенденции в отношении изменений уровней TsPO и каспазы-3, что позволяет предположить о TsPO-независимом развитии апоптоза в клетках плоскоклеточного рака кожи при воздействии ФМА.

Таким образом, остается открытым вопрос о регуляции и функциональной активности TsPO при злокачественных новообразованиях кожи. Известно, что клетки кожи и, в частности, клетки плоскоклеточного рака кожи обладают способностью продуцировать стероидные гормоны [10]. Возможно участие TsPO в реализации стероидогенеза в клетках плоскоклеточного рака. Выявленные изменения экспрессии TsPO в данном эксперименте указывают, что если TsPO участвует в регуляции апоптоза в коже, то посредством другого, протеинкиназа-С-независимого механизма. Одним из таких наиболее вероятных механизмов стоит считать воздействие на функциональную активность антиапоптотического Bcl-2, а также митохондриальных белков ANT и VDAC, которые, с одной стороны, как и TsPO, взаимодействуют с Bcl-2. С другой стороны, являются компонентами митохондриальных пор, образуемых в местах контактов внутренней и наружной митохондриальных мембран [13]. Известно, что открытие митохондриальных пор вызывает падение митохондриального потенциала, высвобождение в цитоплазму цитохрома с с последующей активацией каспаз и развитием апоптоза.

Необходимо дальнейшее разъяснение роли TsPO в реализации апоптоза в клетках кожи, что может быть востребовано для совершенствования терапевтических подходов в дерматоонкологии.

Список литературы

1. Рукша Т.Г., Прохоренков В.И., Салмина А.Б. и др. Апоптоз кератиноцитов и экспрессия периферических бензодиазепиновых рецепторов при псориазе // Вестн. Дерматол. Венерол. — 2004. — №5. — С. 4–6.
2. Рукша Т.Г. Изменение структуры периферического бензодиазепинового рецептора в клетках меланомы после воздействия ультрафиолетовым излучением // Росс. Онкол. Ж. — 2008. — №6. — С. 22–24.
3. Рукша Т.Г. Лиганд периферических бензодиазепиновых рецепторов модулирует пролиферацию клеток кожи // Бюллетень СО РАМН — 2007. — №1. — С. 35–39.
4. Batarseh A., Giatzakis C., Papadopoulos V. Phorbol-12-myristate 13-acetate acting through protein kinase C epsilon induces translocator protein (18-kDa) TsPO gene expression // Biochemistry. — 2008. — Vol. 47. — P. 12886–12899.

5. *Hauet T., Yao Z.-X., Bose H.S.* et al. Peripheral-type benzodiazepine receptor-mediated action of steroidogenic acute regulatory protein on cholesterol entry into Leydig cell mitochondria // *Mol. Endocrinol.* — 2005. — Vol. 19. — P. 540—554.
6. *Kimura H., Minakami H., Sekiguch I.* et al. Phorbol ester facilitates apoptosis in murine fibroblasts pretreated by mild ultraviolet radiation // *J. Biochem.* — 1999. — Vol. 126. — P. 340—346.
7. *Matsumura M., Tanaka N., Kuroki T.* et al. The ϵ isoform of protein kinase C inhibits UV-induced activation of caspase-3 in normal human keratinocytes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2003. — Vol. 303(1). — P. 350—356.
8. *Nakamura J., Suda T., Ogawa Y.* et al. Protein kinase C-dependent and -independent inhibition of Ca^{2+} influx by phorbol ester in rat pancreatic beta-cells // *Cell Signal.* — 2001. — Vol. 13(3). — P. 199—205.
9. *Saeki M., Irie Y., Ni L.* et al. Calcineurin potentiates the activation of procaspase-3 by accelerating its proteolytic maturation // *J. Biol. Chem.* — 2007. — Vol. 282. — P. 11786—11794.
10. *Slominski A., Wortsman J.* Neuroendocrinology of the skin // *Endocr. Rev.* — 2000. — Vol. 21. — P. 457—487.
11. *Stocco D.M., Wang X., Jo Y., Manna P.R.* Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and Steroidogenic Acute Regulatory protein expression: more complicated than we thought // *Mol. Endocrinol.* — 2005. — Vol. 19. — P. 2647—2659.
12. *Stoebner P.E., Carayon P., Casellas P.* et al. Transient protection by peripheral benzodiazepine receptors during the early events of ultraviolet light-induced apoptosis // *Cell Death Differ.* — 2001. — Vol. 8. — P. 747—753.
13. *Veenman L., Papadopoulos V., Gavish M.* Channel-like functions of the 18-kDa translocator protein (TSPO): regulation of apoptosis and steroidogenesis as part of the host-defence response // *Curr. Pharm. Design.* — 2007. — Vol. 13. — P. 2385—2405.
14. *Wheeler D.L., Ness K.J., Oberley T.D., Verma A.K.* Protein kinase $\text{C}\epsilon$ is linked to 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor necrosis factor- α ectodomain shedding and the development of metastatic squamous cell carcinoma in protein kinase $\text{C}\epsilon$ transgenic mice // *Cancer Res.* — 2003. — Vol. 63. — P. 6547—6555.

Поступила 15.02.2011

И.В. Зарубина, П.Д. Шабанов

Значение болевой чувствительности для устойчивости к иммобилизационному стрессу

Федеральное государственное военное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, 194044, Санкт-Петербург, ул. Лебедева, 6

Изучали влияние иммобилизационного стресса (обездвиживание на спине в течение 4 ч) на функциональные показатели крыс самцов Вистар, с разными порогоми болевой чувствительности в тесте отдергивания хвоста (tail-flick). Острый иммобилизационный стресс у крыс с высокой чувствительностью к боли вызывает более значительные изменения основных функциональных систем организма, чем у низкочувствительных к боли животных. Это выражается более значимой гипотензией, брадикардией, снижением температуры, частоты дыхания и потребления кислорода, нарушением кислотно-основного равновесия с признаками лактацидоза. Сделан вывод, что крысы с низкой чувствительностью к боли обладают большей устойчивостью к острому стрессовому воздействию, чем высокочувствительные к боли животные. Это подтверждает важное значение индивидуальной болевой чувствительности для формирования устойчивости организма к стрессу.

Ключевые слова: резистентность, иммобилизационный стресс, болевая чувствительность, тест отдергивания хвоста, кислотно-основное состояние, лактацидоз, крысы

I.V. Zarubina, P.D. Shabanov

Significance of pain sensitivity for the resistance to immobilization stress

S.M. Kirov Military Medical Academy, 6, Acad. Lebedev str., St.Petersburg, 199034, Russia

The effects of immobilization stress (immobilization on back within 4 h) on the functional indexes of Wistar male rats differing with pain sensitivity in the tail-flick test were studied. The acute immobilization stress in rats with high pain sensitivity compared with low pain sensitivity animals produced the most changes of the main functional systems. The high pain sensitivity rats demonstrated more significant hypotension, bradycardia, temperature shift, decrease of breath frequency and oxygen consumption, acid-alkaline equilibrium disorders with lactate acidosis signs. Therefore, the rats with low pain sensitivity possess the high resistance to acute stress exposure in comparison with high pain sensitivity animals. This confirms the important significance of individual pain sensitivity for the formation of stress resistance.

Key words: resistance, immobilization stress, pain sensitivity, tail-flick test, acid-alkaline equilibrium, lactate acidosis, rats

Длительная иммобилизация животных вызывает системную стрессовую реакцию по Г. Селье, что сопровождается нервным возбуждением с последующей активацией системы гипоталамус—гипофиз—кора надпочечников и генерализованными адренергическими реакциями. Современные представления о нейрохимических механизмах ответа на экстремальное воздействие включают в себя совокупность стресс-реализующей (симпато-адреналовой), стресс-потенцирующей (гипоталамо-гипофизарно-адреналовой) и стресс-лимитирующей (эндогенной опиоидной) систем [10]. Их взаимодействие эффективно в условиях относительно слабого по интенсивности и кратковременного повреждающего сти-

мула; при увеличении интенсивности воздействия баланс стресс-регулирующих систем нарушается. При этом доминирует стресс-лимитирующая система, ограничивая выраженность проявлений стресса с помощью активации эндогенной опиоидной системы.

Известно, что опиоидная система участвует в реализации адаптивных реакций, и возрастание ее активности приводит к повышению устойчивости организма к экстремальным воздействиям [11]. Эндогенная антиноцицептивная система, представленная главным образом опиоидными пептидами, регулирует и поддерживает жизненно важную константу организма, эволюционно выработанную и генетически закрепленную — порог боли. Боль как системный интегративный ответ ЦНС на экстремальное воздействие обеспечивает поведенческие, соматические, эмоциональные, вегетативные и

Для корреспонденции: Шабанов Петр Дмитриевич, д-р мед. наук, проф., зав. каф. фармакологии, E-mail: pdshabanov@mail.ru

прочие реакции, направленные на устранение повреждающих факторов стресса и восстановление функциональных систем организма. Взаимосвязь ноцицептивных и антиноцицептивных механизмов формирует болевую чувствительность организма. Исследование показателей болевой реакции у животных с различной прогностической устойчивостью к эмоциональному стрессу позволяет предполагать генетическую предрасположенность групповых различий показателей стресс-резистентности и ноцицепции [1, 5, 7]. Доказано, что поведенчески низкоактивные животные обладают низким болевым порогом и проявляют повышенную чувствительность к патологическим воздействиям в сравнении с высокоактивными [4]. Исследованиями В.К. Кулагина и его школы показано, что высокая резистентность к экстремальным воздействиям (тяжелой травме) связана с повышением устойчивости нервной системы, в частности, к болевому фактору [8].

Цель исследования — изучение роли болевой чувствительности в реализации общих реакций организма на иммобилизационный стресс.

Методика

Опыты проведены на 74 крысах самцах Вистар массой 180—200 г, полученных из питомника «Рапполово» РАМН (Ленинградская область). Индивидуальную болевую чувствительность определяли в тесте отдергивания хвоста (tail-flick) в ответ на ноцицептивный раздражитель [14]. Латентный период отдергивания хвоста регистрировали с помощью оптоэлектронного анальгезиметра ТФ-003 (Россия). Мощность лампы осветителя составляла 50 Вт, сила тока 3 мА, точность регистрации — 0,1 с. Животные с болевым порогом менее 5 с (временем задержки отдергивания хвоста) считались высокочувствительными к боли (ВЧ), более 5 с — низкочувствительными (НЧ) к боли. Спустя сутки после определения порога болевой чувствительности животных иммобилизовали на станках в положении на спине в течение 4 ч. Об общих реакциях организма на тяжелую компрессионную травму судили по изменениям артериального давления (АД), частоты дыхания (ЧД), частоты сердечных сокращений (ЧСС), ректальной температуры (тр_оС), потребления кислорода (ПО₂). Кислотно-основное состояние оценивали по рН артериальной крови, напряжению кислорода (Р_о2), напряжению углекислого газа (Р_{со}2), величине актуального бикарбоната (АВ), содержанию в крови молочной и пировиноградной кислот [15]. Артериальное давление у крыс измеряли в общей сонной артерии с помощью ртутного манометра. Животных оперировали перед иммобилизацией, вводя в сонную артерию заполненный 0,85%-ным раствором хлористого натрия с гепарином и закрытый резиновой пробкой подключичный катетер №3, который закрепляли на боковой поверхности шеи в

складке кожи животного. Частоту сердечных сокращений подсчитывали по интервалу R-R электрокардиограммы, зарегистрированной во втором стандартном отведении на электрокардиографе ЭКСПЧ-061 (Россия) с применением коммутаторного устройства для отдельной регистрации электрокардиограммы у 10 животных. Частоту дыхательных движений у крыс подсчитывали визуально в течение 1 мин. Ректальную температуру измеряли с помощью электротермометра, потребление кислорода у крыс определяли общепринятым методом Миропольского. Показатели кислотно-солевого состояния крови измеряли методом Аструпа на приборе «Микро-аструп» (Дания). Выборка для каждой группы составляла 10—12 животных.

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием стандартного пакета программ Statistika for Windows по общеизвестным методам вариационной статистики с оценкой значимости показателей и различий рассматриваемых выборок по t-критерию Стьюдента. Данное исследование одобрено локальным комитетом по этике Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова.

Результаты и обсуждение

Интактные животные с различной индивидуальной чувствительностью к боли достоверно не отличались по показателям, характеризующим системы внешнего дыхания, кровообращения и температуры. Первые 40 мин иммобилизации крыс сопровождался выраженным возбуждением, двигательным беспокойством, значительной голосовой реакцией. Спустя 60—90 мин состояние возбуждения сменялось угнетением, достигавшим наибольшей глубины к концу иммобилизации. Типологические функционально-метаболические различия естественной резистентности определяют характер ответа при экстремальном воздействии. Действительно, иммобилизация животных в течение 4 ч, являющаяся мощным стрессорным воздействием, у крыс с различной чувствительностью к боли вызывала урежение дыхания, снижение частоты сердечных сокращений, уменьшение потребления кислорода и ректальной температуры, изменения кислотно-основного состояния крови и увеличение содержания молочной и пировиноградной кислот. Эти изменения были более выражены у ВЧ к боли животных.

Сразу после освобождения животных от фиксации у ВЧ к боли крыс достоверно уменьшалась частота дыхания на 24%, потребление кислорода снижалось на 45%, ректальная температура снижалась с $38,6 \pm 0,3$ до $36,8 \pm 0,2$ (табл. 1). Наряду с этим у ВЧ животных снижалось артериальное давление на 15% и ЧСС на 25% (табл. 2). У животных с низкой чувствительностью к боли достоверных изменений показателей системы внешнего дыхания, ректальной тем-

Таблица 1

Влияние иммобилизационного стресса на показатели системы внешнего дыхания и ректальной температуры у крыс с различной чувствительностью к боли ($M \pm m$, $n=10-15$)

Воздействие	ЧД, мин		ПО ₂ , мл/мин 100 г ⁻¹		t _p , °C	
	НЧ	ВЧ	НЧ	ВЧ	НЧ	ВЧ
Интактные	136±13	132±14	3,52±0,25	4,43±0,27	38,8±0,2	38,6±0,3
Иммобилизация	125±11	100±12*	3,11±0,31	2,00±0,35*	38,2±0,3	36,8±0,2*

Примечание. * — достоверные различия ($p < 0,05$) по сравнению с интактными животными

Таблица 2

Влияние иммобилизационного стресса на показатели системы кровообращения крыс с различной чувствительностью к боли ($M \pm m$, $n=10-15$)

Воздействие	АД, мм рт.ст.		ЧСС, уд./мин	
	НЧ	ВЧ	НЧ	ВЧ
Интактные	130±3	128±5	482±8	478±12
Иммобилизация	125±4	110±6*	406±9*	350±11*

Примечание. * — достоверные различия ($p < 0,05$) по сравнению с интактными животными

Таблица 3

Влияние иммобилизационного стресса на изменение показателей кислотно-основного состояния крови крыс с различной чувствительностью к боли ($M \pm m$, $n=10-20$)

Показатели	Воздействие	Группы	
рН	Интактные	НЧ	7,45±0,01
		ВЧ	7,42±0,03
	Иммобилизация	НЧ	7,38±0,02
		ВЧ	7,17±0,03*
Р _{о2} , мм рт.ст.	Интактные	НЧ	97,85±0,45
		ВЧ	90,23±0,48
	Иммобилизация	НЧ	88,15±0,51
		ВЧ	77,12±0,61*
Р _{со2} , мм рт.ст.	Интактные	НЧ	35,21±0,46
		ВЧ	40,34±0,54
	Иммобилизация	НЧ	39,50±0,62
		ВЧ	46,70±0,81*
Актуальный бикарбонат (АВ), ммоль/л	Интактные	НЧ	32,14±0,44
		ВЧ	27,22±0,52
	Иммобилизация	НЧ	26,22±0,23
		ВЧ	20,11±0,42*

Примечание. * — достоверные различия ($p < 0,05$) по сравнению с интактными животными

Таблица 4

Влияние иммобилизационного стресса на содержание лактата и пирувата в крови крыс с различной чувствительностью к боли ($M \pm m$, $n=10-15$)

Воздействие	Лактат, ммоль/л		ПВК, ммоль/л	
	НЧ	ВЧ	НЧ	ВЧ
Интактные	2,1±0,2	3,4±0,3	2,0±0,3	1,5±0,2
Иммобилизация	3,0±0,4*	5,5±0,5*	2,8±0,7	3,2±0,3*

Примечание. * — достоверные различия ($p < 0,05$) по сравнению с интактными животными

пературы и кровообращения не наблюдалось, за исключением ЧСС, которая умеренно снижалась.

Иммобилизационный стресс вызывает дисфункцию капиллярного звена микроциркуляторного русла [3]. Нарушение микроциркуляции приводит к снижению доставки кислорода к тканям и, как следствие этого, усилению гликолитических процессов в клетках с образованием избыточного количества нелетучих кислот и изменениям кислотно-основного состояния крови. Интегральным показателем состояния физиологических механизмов компенсации при иммобилизационном стрессе служит выраженность сдвигов кислотно-основного состояния крови. Такие показатели, как рН крови, величина буферных оснований, напряжение кислорода и углекислого газа, являются прогностически значимыми и могут использоваться для оценки резистентности организма [9].

Сразу после иммобилизации животных наблюдали изменения кислотно-основного состояния крови. Величина рН крови у НЧ крыс с $7,45 \pm 0,01$ снижалась до $7,30 \pm 0,02$, у ВЧ крыс — с $7,42 \pm 0,02$ до $7,17 \pm 0,03$, (табл. 3). В крови НЧ животных уменьшалось напряжение кислорода на 11%, ВЧ — на 15% и возрастало напряжение углекислоты на 12 и 16% соответственно. Значения актуального бикарбоната в крови НЧ крыс уменьшались на 18 и 29% соответственно ($p < 0,05$). Наряду с этим в крови животных обеих групп наблюдали гиперлактацидемию на фоне увеличения содержания пирувата. Содержание лактата в крови НЧ животных увеличивалось на 43%, в крови ВЧ крыс — на 62%, содержание пирувата возрастало на 40% и в 2 раза соответственно (табл. 4). Следовательно, сразу после длительной иммобилизации у животных обеих групп развивался метаболический ацидоз, наиболее выраженный у ВЧ к боли животных.

Таким образом, иммобилизационный стресс у животных с высокой и низкой чувствительностью к боли вызывает качественно одинаковые изменения функционального состояния, что выражается в гипотензии, брадикардии, снижении температуры, частоты дыхания и потребления кислорода, нарушении кислотно-основного равновесия с признаками лактацидоза. Однако выраженность этих изменений у животных неодинакова. Очевидно, что животные с низкой чувствительностью к боли обладают большей устойчивостью к острому стрессовому воздействию, чем высокочувствительные к боли животные.

Полученные результаты, безусловно, следует обсуждать с позиции вовлечения в данный процесс и механизмов реализации стресс-лимитирующих (опиоидных) систем организма. В головном мозге они представлены главным образом скоплением энкефалинергических нейронов в области серого околоводопровод-

ного вещества и имеют восходящие и нисходящие (в спинной мозг) проекции [2]. Активация нисходящих энкефалинергических нейронов меняет афферентные потоки болевой чувствительности и, следовательно, повышает пороги боли. Этот феномен, по-видимому, и лежит в основе индивидуально сниженной болевой чувствительности [5, 6, 13]. В то же время, опиоидные системы контролируют не только антиноцицептивную чувствительность: ведь на болевой раздражитель реагируют помимо ноцицепторов рецепторы дальней модальности — термо-, хемо-, волюмо- и тактильные рецепторы кожи и внутренних органов [12]. Они запускают, с одной стороны, ноцицептивные системы мозга, обеспечивая проведение болевого импульса и формирование реакции на боль, с другой, — активацию важнейших системных реакций организма по поддержанию гомеостаза в новых условиях, в том числе системы кровообращения, крови, дыхания, метаболизма (эндокринную). Эти системы формируют быструю адаптацию к чрезвычайным ситуациям, включая мощное стрессорное воздействие, как в наших исследованиях. Поэтому мы и регистрировали значимые перестройки в основных функциональных системах в процессе иммобилизации животных. Схожесть пусковых механизмов, активирующих ноцицептивную-антиноцицептивную систему и реакции на острый иммобилизационный стресс, позволяет допустить, что адаптационный (физиологический) ответ на иммобилизацию зависит от состояния этой системы.

В наших исследованиях было показано, что крысы с низкой чувствительностью к боли обладают большей устойчивостью к острому стрессовому воздействию, чем высокочувствительные к боли животные. Видимо, нейрохимическое звено, связывающее эти два явления, вовлекает сходные афферентные триггеры — активацию ноцицепторов при реализации боли и активацию гомеостатических реакций через разные рецепторы, включая ноцицепторы.

Список литературы

1. *Абрамов Ю.Б., Козлов А.Ю., Мезенцева Л.В.* Анализ порогов болевой реакции у крыс с различной устойчивостью к эмоциональному стрессу // *Боль*. — 2006. — №3. — С. 12—15.
2. *Волчков В.А., Игнатов Ю.Д., Страшнов В.И.* Болевые синдромы в анестезиологии и реаниматологии. — М.: Медпресс-Информ, 2006. — 320 с.
3. *Даниелян М.А.* Реакция капилляров мозга крыс на иммобилизационный стресс // *Морфология*. — 2007. — Т. 132, №6. — С. 39—41.
4. *Епишина В.В., Багметов М.Н., Тюренков И.Н.* Модуляция порога болевой чувствительности животных с различным типом поведения с помощью гетероциклического соединения РГПУ-195 // *Успехи совр. естествознания*. — 2007. — №1. — С. 62—63.
5. *Зарубина И.В., Юнусов И.А., Шабанов П.Д.* Значение индивидуальной устойчивости к гипоксии для тече-

ния тяжелой компрессионной травмы // Патол. физиол. и эксперим. терапия. — 2010. — №3. — С. 24–29.

6. **Зарубина И.В., Юнусов И.А., Шабанов П.Д.** Эффективность антигипоксантов при травматическом токсикозе // Мед.-биол. и социально-психол. пробл. безопасности в чрезвычайных ситуациях. — 2009. — №2. — С. 68–72.

7. **Коплик Е.В., Горбунова А.В., Салиева Р.М.** Тест «открытое поле» как прогностический критерий устойчивости к эмоциональному стрессу у крыс линии Вистар // Журн. высш. нервн. деят. — 1995. — №4. — С. 775–781.

8. **Кулагин В.К.** Патологическая физиология травмы и шока. — Л.: Медицина, 1978. — 296 с.

9. **Лукьянова Л.Д.** Функционально-метаболические особенности животных с различной резистентностью к гипоксии // Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты. — М.; Воронеж: Истоки, 2004. — С. 156–169.

10. **Парин С.Б.** Нейрохимические и психофизиологические механизмы стресса и шока. — Н. Новгород: Изд-во ННГУ, 2001. — С. 20–28.

11. **Токавин А.И.** Опиатная система и ее роль в обеспечении циркуляторного гомеостаза при шоке // Патол. физиол. и эксперим. терапия. — 1990. — №2. — С. 23–26.

12. **Шабанов П.Д.** Психофармакология. — СПб.: Элби-СПб, 2008. — 416 с.

13. **Юнусов И.А., Зарубина И.В.** Энергостабилизирующие эффекты цитофлавина при тяжелой компрессионной травме конечностей // Психофармакол. и биол. наркол. — 2009. — Т. 9, №1–2. — С. 2540–2545.

14. **Kawakita K., Funakoshi M.** A quantitative study on the tail flick test in the rat // *Physiol. and Behav.* — 1987. — Vol. 39, №2. — P. 235–240.

15. **Marbach E.P., Weil M.H.** Rapid enzymatic measurement of blood lactate and pyruvate // *Clin. Chem.* — 1967. — Vol. 13. — P. 314–325.

Поступила 17.01. 2011

Сведения об авторах:

Зарубина Ирина Викторовна, д-р биол. наук, проф., ст. науч. сотр. каф. фармакологии ФГБОУ ВПО ВМА им. С.М. Кирова

А.В. Каплиев, В.Г. Овсянников

Особенности бульбо-спинальной серотонинергической реакции у крыс раннего возраста при острой соматической боли

Государственное бюджетное образовательное учреждение «Ростовский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации,
344022, г. Ростов-на-Дону, Нахичеванский пер., 29

У самцов белых крыс первого месяца жизни (2—4-дневных, 17—18-дневных, 30—35-дневных) исследовали постнатальные изменения фоновой и стрессорной (при электрокожноноцицептивном раздражении) концентрации серотонина (С) и 5-оксииндолуксусной кислоты (5-ОИУК) в продолговатом и спинном мозге. У интактных животных трёх возрастных групп не выявлено различий концентрации С в продолговатом мозге. Концентрация С в спинном мозге и 5-ОИУК в обеих структурах изменялась фазно: снижалась к моменту прозревания и увеличивалась к месячному возрасту. Болевая реакция у крыс всех возрастных групп характеризовалась: у 2—4-дневных — ростом спинального пула С и 5-ОИУК и уменьшением фракции 5-ОИУК в продолговатом мозге; у 17—18-дневных — гипоС-сдвигом в обеих структурах, с уменьшением 5-ОИУК в спинном мозге и ростом в продолговатом; у 30—35-дневных — выраженной редукцией С и 5-ОИУК на бульбо-спинальном уровне. Обсуждаются механизмы выявленных постнатальных изменений метаболизма С в ЦНС и их роль в формировании возрастных особенностей болевой чувствительности в раннем онтогенезе.

Ключевые слова: серотонин, боль, ЦНС, онтогенез

A.V. Kapliev, V.G. Ovsjannikov

The features of bulbo-spinal serotoninergic reaction in the young rats under the condition of acute somatic pain

Medical State University of Rostov-on-Don, 29, Nachitsevskij, Rostov-on-Don, 344022

Postnatal changes of background and stress-induced (by electric skin nociceptive irritation) concentrations of serotonin (S) and 5-oxindolacetic acid (5-OIAA) in medulla oblongata and in spinal marrow was investigated using the male white rats (2—4, 17—18 and 30—35 days old). In the intact rats of these three groups the differences of S concentration in medulla oblongata were not revealed. S concentration in spinal marrow and 5-OIAA concentrations in both structures were changed in phase: decreased during vision-appearing period and increased during 1 month age. Rats of three groups showed the following reactions to the pain: 2—4 day rats — increase of spinal pool of S and 5-OIAA and decrease of 5-OIAA fraction in medulla oblongata; 17—18 day rats — hypo-S-shift in both structures, decrease 5-OIAA in spinal marrow and its increase in medulla oblongata; 30—35 day rats — pronounced reduction of both S and 5-OIAA at a bulbo-spinal level. Mechanisms of revealed postnatal changes of S metabolism in CNS and their role in age features of pain sensitivity formation in early ontogenesis were discussed.

Key words: serotonin, pain, CNS, ontogenesis

Известно, что серотонинергическая система нижних отделов ЦНС играет важную роль в механизмах регуляции болевой чувствительности, оказывая как тормозное, так и возбуждающее действие на нейроны, участвующие в механизмах трансмиссии и модуляции ноцицептивного сигнала [3,6]. Вместе с тем, до насто-

ящего времени остаются недостаточно изученными процессы онтогенетического становления центральных серотонинергических механизмов ноци- и антиноцицепции, конкретизация которых необходима для понимания как общего патогенеза боли, так и связанных с возрастом особенностей болевой реактивности.

Цель исследования — изучение возрастных особенностей серотонинергической реакции на бульбо-спинальном уровне ЦНС у крыс первого месяца жизни при острой соматической боли.

Для корреспонденции: Каплиев Андрей Викторович, канд. мед. наук, асс. каф. патологической физиологии ГБОУ ВПО РостГМУ Минздравсоцразвития России

Методика

Работа выполнена на 60 нелинейных самцах белых крыс трёх возрастных групп (2—4-дневных, 17—18-дневных, 30—35-дневных) по 20 животных в каждой. Проведено 2 серии исследований: контрольная и с моделированием острой соматической боли (ОСБ). Возрастные группы формировались в соответствии с физиологическими критериями периодизации постнатального онтогенеза крыс: 1—7-е сут. — период новорожденности; 16—18-е сут. — период прозревания и усиления ориентировочно-двигательной активности; конец 1-го начало 2-го мес. жизни — ранний препубертатный период. Все экспериментальные животные рождались и росли в стационарных условиях вивария в режиме естественной освещенности и вскармливания.

Для моделирования ОСБ использовали метод электрокожной стимуляции рецепторной зоны корня хвоста крысы прямоугольным импульсным током (частота — 60 Гц, амплитуда — 20—40 В, время воздействия — 2 мин; длительность импульса — 0,05 с, задержка импульса — 0,5 с). Интенсивность болевого раздражения (4-й — 5-й уровень интенсивности) оценивали по характеру поведенческих и вегетативных реакций животного [1]. Через 2 мин после электростимуляции крыс декапитировали, извлекали спинной и продолговатый мозг для биохимического анализа. Серотонина (С) и продукта его окислительного дезаминирования 5-оксииндолауксусную кислоту (5-ОИУК) определяли высокочувствительным флюорометрическим микрометодом с использованием специфического для 5-оксииндолов реагента — ор-

тофталевого альдегида [2]. Интенсивность флюоресценции стандартных и опытных образцов измеряли на спектрофлюорометре MPF-4 фирмы «Hitachi».

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием t-критерия Стюдента—Фишера при помощи программы «Stadia». Статистически значимыми считали отличия, соответствующие уровню значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В контрольных экспериментах у интактных крыс трёх возрастных групп не выявлено различий в содержании С в продолговатом мозге, тогда как его концентрация в спинном мозге опытных животных достоверно менялась с возрастом: к 17—18 сут. жизни уменьшалась на 39% и в дальнейшем увеличиваясь вдвое и к 35 сут. постнатального периода (таблица) увеличивалась вдвое. Постнатальные изменения во фракции 5-ОИУК в обеих мозговых структурах крыс на первом месяце жизни имели однотипный характер, но были более выражены в спинном мозге. К моменту прозревания животных концентрация метаболита в продолговатом и спинном мозге уменьшалась по сравнению с неонатальным периодом соответственно на 16 и 30%, а к препубертатному возрасту вновь возрастала в среднем на 75% (таблица, рисунок).

Болевое воздействие у новорожденных крыс не вызывало существенных изменений содержания С в продолговатом мозге, тогда как концентрация его метаболита в этой структуре уменьшалась на 18%. В спинном мозге животных данной возрастной группы регистрировался существенный рост С и 5-ОИУК соответственно на 40 и 22%. У прозре-

Таблица

Содержание 5-оксииндолов (нг/мг сырой ткани) в спинном и продолговатом мозге самцов белых крыс раннего возраста в норме и при острой соматической боли

Возраст	Структуры мозга	Группы	5-оксииндолы	
			Серотонин	5-ОИУК
2—4-дневные	Продолговатый мозг	Контроль	0,64±0,031	0,44±0,022
		Боль	0,61±0,065	0,36±0,017*
	Спинной мозг	Контроль	1,12±0,099	0,54±0,039
		Боль	1,56±0,124*	0,66±0,042*
17—18-дневные	Продолговатый мозг	Контроль	0,65±0,027	0,37±0,02 ⁺
		Боль	0,56±0,028*	0,46±0,024* ⁺
	Спинной мозг	Контроль	0,68±0,043 ⁺	0,38±0,025 ⁺
		Боль	0,45±0,022* ⁺	0,36±0,028 ⁺
30—35-дневные	Продолговатый мозг	Контроль	0,69±0,048	0,66±0,043 ⁺
		Боль	0,61±0,027	0,38±0,033*
	Спинной мозг	Контроль	1,42±0,13 ⁺	0,66±0,037 ⁺
		Боль	0,53±0,028*	0,37±0,018*

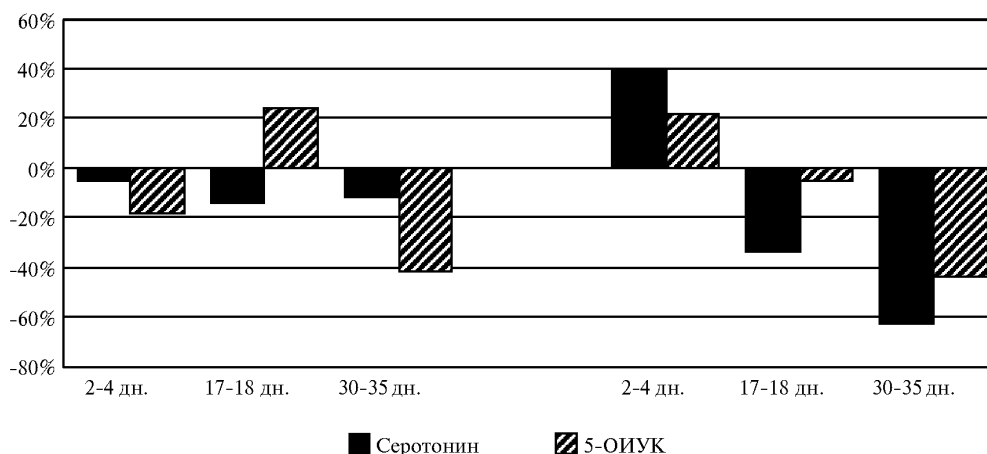
Примечание. * — различия достоверны по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0,05$); ⁺ — различия достоверны по сравнению с предыдущей возрастной группой ($p \leq 0,05$)

ших самцов болевое воздействие снижало концентрацию С в обеих мозговых структурах, и было более выраженным в спинном мозге. При этом только в продолговатом мозге 17—18-дневных животных регистрировался рост 5-ОИУК. У крыс месячного возраста болевая реакция сопровождалась выраженной редукцией спинального пула С (на 63%) и пула 5-ОИУК как в спинном, так и продолговатом мозге более чем на 40% (рисунок).

Характер выявленных в данном исследовании возрастных изменений фоновой и «стрессорной» при остром ноцицептивном воздействии концентрации С и 5-ОИУК на бульбо-спинальном уровне у крыс первого месяца жизни отражает, на наш взгляд, основные закономерности морфофункционального созревания ЦНС в раннем постнатальном онтогенезе. Так, стабилизация «неонатального» уровня С в продолговатом мозге интактных крыс на первом месяце жизни подтверждает представления о раннем созревании нейрональных структур каудальных отделов мозга, ответственных за реализацию и регуляцию основных витальных функций. Регистрируемые в этот период фазные изменения 5-ОИУК (снижение к 17—18 сут. и рост к 30—35 сут. постнатального периода) на бульбо-спинальном уровне могут быть обусловлены генетически детерминированными изменениями ферментативной системы окислительного дезаминирования моноаминов. Существуют данные [8], что у крыс к моменту открытия глаз (17—18 сут. постнатального онтогенеза) регистрируется снижение экспрессии МАО-А в мозге, в дальнейшем активность данного фермента возрастает, достигая уровня взрослых животных к концу 1-го месяца жизни. Можно полагать, что наблюдаемая в этом возрастном

периоде у крыс при ОСБ относительная «ареактивность» С-пула продолговатого мозга также в значительной мере связана со стрессорными колебаниями моноаминоксидазной активности. Это предположение подтверждается регрессивной динамикой содержания 5-ОИУК в продолговатом мозге новорожденных и 30—35-дневных крыс с ОСБ, в основе которой, по-видимому, лежит компенсаторное снижение активности МАО, направленное на поддержание оптимального уровня и пролонгирование биологического действия С в данной мозговой структуре в экстремальной ситуации.

Более чётко онтогенетическая динамика серотонинергической активности как в норме, так и при острой боли, проявляется у крыс на спинальном уровне. Высокая фоновая концентрация С и 5-ОИУК в спинном мозге новорожденных крыс и её рост при болевом воздействии согласуются с концепцией паракрино-эндокринной активности развивающегося мозга в раннем онтогенезе [7]. Установлено, что растущие и дифференцирующиеся нейроны способны активно секретировать в межклеточное пространство различные биологически активные вещества, в том числе и С. До закрытия гематоэнцефалического барьера (у крыс к концу второй недели постнатального периода) они могут свободно проникать в спинномозговую жидкость и кровь, откуда вновь захватываются нейрональными структурами [4]. Снижение концентрации С и 5-ОИУК в спинном мозге интактных крыс к моменту прозревания и последующее её повышение к концу первого месяца жизни связано, по всей вероятности, с закрытием гематоэнцефалического барьера и формированием спинального нейронального пула этих веществ в ходе активного синаптогенеза прорастаю-



Возрастные особенности реактивных сдвигов серотонина и 5-оксииндолуксусной кислоты на бульбоспинальном уровне у крыс первого месяца жизни при острой соматической боли.

Темные столбцы — серотонин; заштрихованные — 5-ОИУК.

По оси абсцисс — возраст (сут.);

по оси ординат — изменения содержания С и 5-ОИУК при острой соматической боли (% от значений у интактных животных)

щих на сегментарный уровень аксонов серотонинергических нейронов. Действительно, в продолговатом мозге описаны группы нейронов, аксоны которых заканчиваются в желатинозной субстанции задних рогов спинного мозга [5]. Разная степень морфофункциональной зрелости этих проводящих путей объясняет одинаковую по направленности, но разную по выраженности серотонинергическую реакцию спинного мозга у прозревших и месячных крыс при ОСБ. Снижение концентрации С в спинном мозге крыс при боли, наиболее выраженное у 30—35-дневных животных, является, вероятно, следствием резкого усиления его утилизации в медиаторном процессе. С позиций системной саморегуляции дефицит С на входе болевого импульса можно рассматривать как сигнальный элемент активирующего механизма обратной связи в антиноцицептивной системе, срабатывающий по схеме: ноцицептивная афферентация → срочная мобилизация и снижение базового резерва антиноцицептивного С-компонента → ослабление нисходящего контроля болевой чувствительности → «облегчение» потока ноцицептивной информации в высшие отделы головного мозга → активация центров антиноцицептивной системы. С другой стороны, формирующаяся в инициальном периоде болевой реакции у прозревших и месячных крыс на спинальном уровне гипосеротонинергия может являться проявлением возрастной «недостаточности» антиноцицептивной системы, обусловленной низкой лабильностью нейронных механизмов нисходящего контроля боли.

Полученный в нашем исследовании материал демонстрирует основную направленность онтогенетической динамики серотонинергической бульбо-спинальной реакции при ОСБ у крыс первого месяца жизни: от «неонатальной» реакции с выраженным гиперергическим спинальным компонентом, до реакции «редук-

тивного» типа у месячных крыс, инициирующей срочную активацию антиноцицептивных механизмов. Очевидно, что принципиальные различия нейрохимического системного обеспечения ноци- и антиноцицептивного процесса в разные периоды раннего онтогенеза определяют специфику болевых синдромов в детском возрасте.

Список литературы

1. *Васильев Ю.Н., Игнатов Ю.Д., Кочан А.Г., Богданов Н.Н.* Анальгетические эффекты акупунктура у крыс в свободном поведении и его изменение под влиянием морфина и налоксона // Бюлл. Экспер. биол. и мед. — 1979. — №11. — С. 566—569.
2. *Коган Б.М., Ничаев Н.В.* Чувствительный и быстрый метод одновременного определения дофамина, норадреналина, серотонина, 5-ОИУК в одной пробе // Лабораторное дело. — 1979. — №5. — С. 301—303.
3. *Кукушкин М.Л., Хитров Н.К.* Общая патология боли. — М.: Медицина, 2004. — 144 с.
4. *Насырова Д.И., Уртикова Н.А., Сапронова А.Я., Узрюмов М.В.* Мозг — один из источников серотонина в крови у крыс в перинатальном периоде развития // Онтогенез. — 2009. — Т. 40, №1. — С. 55—64.
5. *Овсянников В.Г.* Боль (этиология, патогенез, принципы и механизмы лечения). — Ростов-на-Дону: РГУ, 1990. — 80 с.
6. *Овсянников В.Г.* Очерки патофизиологии боли: Учебное пособие для студентов и врачей. — Ростов-на-Дону: РГМУ, 2003. — 148 с.
7. *Узрюмов М.В.* Мозг в роли эндокринной железы во взрослом и развивающемся организме // Российский физиол. журн. им. И.М. Сеченова. — 2004. — Т. 90, №5. — С. 625—637.
8. *Vitalis T., Fouquet C., Alvarez C.* et al. Developmental expression of monoamine oxidases A and B in the central and peripheral nervous systems of the mouse // J. Comp. Neurol. — 2002. — Jan. 21. — Vol. 442(4). — P. 331—347.

Поступила 12.05.2011

Сведения об авторах:

Овсянников Виктор Григорьевич, д-р мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии ГБОУ ВПО РостГМУ Минздрава России

Ю.О. Федотова

Стимуляция D₂-типа дофаминовых рецепторов улучшает пассивное обучение у самок крыс

Учреждение Российской академии наук Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,
199034, Санкт-Петербург, Набережная Макарова, 6

Работа посвящена сравнительному анализу роли D₂-типа дофаминовых рецепторов в механизмах реализации когнитивных процессов при естественном циклическом изменении уровня половых гормонов у взрослых самок крыс. Исследовали влияние хронического введения (14 дней) агониста D₂-типа дофаминовых рецепторов — квинпиrolа (0,1 мг/кг, внутривнутрино) и антагониста D₂-типа дофаминовых рецепторов — сульпирида (10,0 мг/кг, внутривнутрино) самкам в различные фазы полового цикла на условнорефлекторные реакции животных. В качестве поведенческих тестов использовали методику условной реакции пассивного избегания и водный тест Морриса. Хроническое введение квинпиrolа самкам приводило к воспроизведению условной реакции пассивного избегания в фазы проэструса и эструса в отличие от контрольных самок. Кроме того, квинпиrol улучшал динамику пространственного обучения в водном тесте Морриса у самок в фазу проэструса, а также стимулировал пространственное обучение в фазу эструса по сравнению с контролем. Хроническое введение сульпирида однотипно нарушало процессы непространственного и пространственного обучения у самок независимо от фазы полового цикла. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о модулирующей роли D₂-типа дофаминовых рецепторов в процессе обучения у крыс в ключевые фазы полового цикла.

Ключевые слова: квинпиrol, сульпирид, D₂-тип дофаминовых рецепторов, обучение, половой цикл, крысы-самки

Yu.O. Fedotova

Stimulation of D₂-receptors improves passive avoidance learning in female rats

Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, 6, Makarova str., St.Petersburg, 199034, Russia

The involvement of D₂-receptors in learning/memory processes during ovary cycle was assessed in the adult female rats. Quinperole (0,1 mg/kg, i.p.), D₂-receptor agonist and sulpiride (10,0 mg/kg, i.p.), D₂-receptor antagonist were injected chronically to adult female rats. Learning of these animals was assessed in different models: passive avoidance performance and Morris water maze. Chronic quinperole administration to females resulted in the appearance of the passive avoidance performance in proestrous and estrous, as distinct from the control animals. Also, quinperole improved spatial learning in proestrous and stimulated it in estrous in Morris water maze. Chronic sulpiride administration similarly impaired non-spatial and spatial learning in females during all phases of ovary cycle. The results of the study suggest modulating role of D₂-receptors in learning/memory processes during ovary cycle in the adult female rats.

Key words: quinperole, sulpiride, D₂-receptors, learning, ovary cycle, female rats

Дофаминергическая система мозга принимает участие в реализации многих физиологических механизмов у животных и человека: процессы обучения и памяти, бодрствования и сна, болевой синдром и тревожно-депрессивные состояния [6, 7, 11].

В настоящее время установлено, что уровень половых гормонов, в частности эстрогенов, оказывает выраженное модулирующее влияние на функциональную активность nigrostriатной дофаминергической системы [4, 5, 12].

В целом, под влиянием эстрогенов в течение полового цикла в мозге крыс: изменяется активность тирозингидроксилазы в стриатуме, синтез и секреция дофамина, концентрация дофаминовых рецепторов разных подтипов, а также стимулированный фенамином выход дофамина [5, 10, 12]. Было показано, что некоторые дофаминергические препараты, введенные однократно за 30 мин до проведения поведенческих тестов, могут модулировать характер когнитивно-аффективного статуса у самок в разные фазы полового цикла [9]. Однако такие исследования неоднозначны вследствие отсутствия сравнительного анализа эффектов как агонистов, так и антагонистов разных типов дофаминовых рецепторов.

Для корреспонденции: Федотова Юлия Олеговна, д-р биол. наук, ст. науч. сотр., лаб. нейроэндокринологии НИИИФ им. И.П. Павлова РАН. E-mail: julia.fedotova@mail.ru

Цель работы — изучение роли D_2 -типа дофаминовых рецепторов в условнорефлекторной деятельности самок крыс при естественном циклическом изменении уровня эстрогенов в ключевые фазы оварийного цикла.

Методика

Работа выполнена на 120 белых самках крыс Вистар, массой 200—220 г, полученных из питомника «Рапполово». Животные содержались в виварии при естественном освещении и максимальной стандартизации температурного и пищевого режимов со свободным доступом к еде и воде. Исследования проводили в первой половине дня (9.00 — 12.00), в фазах диэструса, эструса и проэструса. Использованы фармакологические лиганды фирмы Сигма (США).

Для выполнения каждой поведенческой методики крыс разделяли на группы по 8 — 10 особей в каждой: животным контрольных групп (1, 2, и 3-я группы) вводили физиологический раствор в фазы диэструса, эструса и проэструса; в группах 4, 5, 6-й крысы получали квинпирол (0,1 мг/кг, внутривнутрибрюшинно), в те же фазы, в группах 7, 8, и 9-й — сульпирид (10,0 мг/кг, внутривнутрибрюшинно), в каждой фазе цикла соответственно.

На протяжении 8 сут. до начала эксперимента у крыс брали влагалищные мазки, в которых по морфологическим признакам определяли фазы полового цикла [2]. В эксперименты отбирали самок, у которых наблюдался стабильный 4-дневный эстральный цикл.

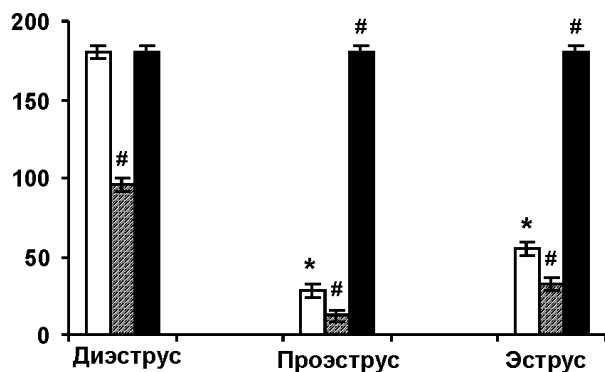


Рис. 1. Влияние хронического введения сульпирида и квинпирола на формирование и воспроизведение условной реакции пассивного избегания у самок крыс.

По вертикали — латентный период захождения животного в темную камеру через 24 ч (в секундах); по горизонтали — фазы оварийного цикла.

Светлые столбики — контроль; серые — самки + сульпирид; темные — самки + квинпирол;

* — $p < 0,05$, достоверное отличие от самок в фазе диэструса; # — $p < 0,05$, достоверное отличие от контрольных самок в соответствующих фазах полового цикла

Процесс обучения проводили на модели непространственного обучения — условная реакция пассивного избегания (УРПИ) и на модели пространственного обучения — водный тест Морриса [1, 3].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа two-way ANOVA test с последующим post-hoc тестом Ньюмана—Келса с помощью пакета программ SPSS 9.0. Различия между значениями при $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведены результаты, двухфакторный дисперсионный анализ которых, выявил достоверные эффекты влияния препарата ($F(3,90)=4,27$, $p < 0,05$) и гормонального фактора (фаза полового цикла) ($F(3,90)=3,40$, $p < 0,05$), а также взаимодействия между этими факторами ($F(3,90)=5,81$, $p < 0,001$) на воспроизведение УРПИ у самок крыс. Post-hoc-анализ также выявил достоверные различия между контрольными и экспериментальными группами при анализе данных теста УР пассивного избегания ($p < 0,05$).

Следует отметить, что в контрольной группе самок только в фазу диэструса наблюдалось воспроизведение данного рефлекса. В то же время как в фазу эструса, так и в фазу проэструса происходила амнезия УРПИ.

На фоне хронического введения сульпирида у самок независимо от фазы полового цикла нарушалась способность к воспроизведению УРПИ. В условиях хронического введения квинпирола у самок в ключевые фазы полового цикла регистрировалось воспроизведение УРПИ (рис. 1).

Двухфакторный дисперсионный анализ данных, полученных в водном тесте Морриса при тренировочной и экспериментальной сессиях, позволил установить достоверные эффекты действия препарата ($F(3,90)=8,32$, $p < 0,05$), ($F(3,90)=5,40$, $p < 0,05$) и гормонального фактора (фаза полового цикла) ($F(3,90)=2,40$, $p < 0,05$), ($F(3,90)=2,45$, $p < 0,05$) а также взаимодействия между этими факторами ($F(3,90)=5,36$, $p < 0,005$), ($F(3,90)=2,85$, $p < 0,05$) у самок крыс. Post-hoc-анализ продемонстрировал достоверные различия между контрольными и экспериментальными группами при анализе результатов тренировочной и экспериментальной серий водного теста Морриса ($p < 0,05$).

Установлено, что у самок контрольной группы в фазу эструса происходит улучшение процесса пространственного обучения, тогда как в фазу проэструса — ухудшение способности животных к пространственному обучению.

Как видно из представленных результатов, при введении сульпирида независимо от фазы полового цикла существенно угнетается способность самок к пространственному обучению (рис. 2). В то же время введение квинпиrolа в фазу проэструса восстанавливает процесс пространственного обучения, тогда как в фазу эструса данное вещество оказывает стимулирующее влияние на пространственное обучение по сравнению с контрольными группами крыс в соответствующих фазах цикла (рис. 2).

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о разнонаправленном влиянии селективного агониста или антагониста D_2 -типа дофаминовых рецепторов на процессы пространственного и непространственного обучения в условиях естественного циклического изменения уровня эстрогенов в организме. Кроме того, полученные результаты исследования доказывают, что препараты, влияющие на дофаминергическую нейротрансмиссию, могут модулировать когнитивные процессы у самок в ключевые фазы полового цикла. Модель УРПИ показала, что хроническое введение самкам антагониста D_2 -типа дофаминовых рецепторов — сульпирида нарушало непространственное обучение не только в фазы проэструса или эструса, но и в фазу диэструса. Это говорит о том, что блокада D_2 -типа дофаминовых рецепторов нивелирует различия в способности крыс к обучению в течение полового цикла. Хроническое введение агониста D_2 -типа дофаминовых рецепторов квинпиrolа восстанавливало воспроизведение УРПИ у самок в ключевые фазы полового цикла, т.е. стимуляция центральных D_2 -типа дофаминовых рецепторов также устраняет различия в пассивном избегании, связанные с естественным гормональным статусом самок. Однако следует подчеркнуть, что влияние стимуляции или блокады D_2 -типа дофаминовых рецепторов на пассивное обучение прямо противоположно, хотя и не определяется фазой полового цикла.

Модель пространственного обучения в водном тесте Морриса выявила сходный угнетающий эффект антагониста D_2 -типа дофаминовых рецепторов сульпирида на способность к обучению самок независимо от фазы полового цикла. В то же время, хроническое введение агониста D_2 -типа дофаминовых рецепторов квинпиrolа интактным самкам улучшало динамику пространственного обучения самок крыс в фазу проэструса (высокий уровень эстрадиола) и стимулировало процесс пространственного обучения в фазу эструса (низкий уровень эстрадиола).

Результаты теста на пространственное обучение, подобно результатам теста на непространственное обучение, указывают на то, что центральные дофаминовые рецепторы D_2 -типа играют роль в процессах обучения на нейрoхимическом уровне у самок крыс в

течение полового цикла, но это в большей степени является гормон-независимым процессом. По-видимому, способность к условнорефлекторной деятельности самок в течение полового цикла в большей степени определяется измененной функциональной активностью нейромедиаторных систем, возникшей вследствие разного уровня половых гормонов в организме.

Противоположно направленные эффекты агониста и антагониста D_2 -типа дофаминовых рецепторов на условнорефлекторную деятельность у самок могут быть связаны с измененным метаболизмом ДА и характером экспрессии D_2 -типа дофаминовых рецепторов, а также с измененной экспрессией — формы эстрогеновых рецепторов и их связывающей способности в структурах головного мозга, имеющих непосредственное отношение к когнитивным функциям [4,

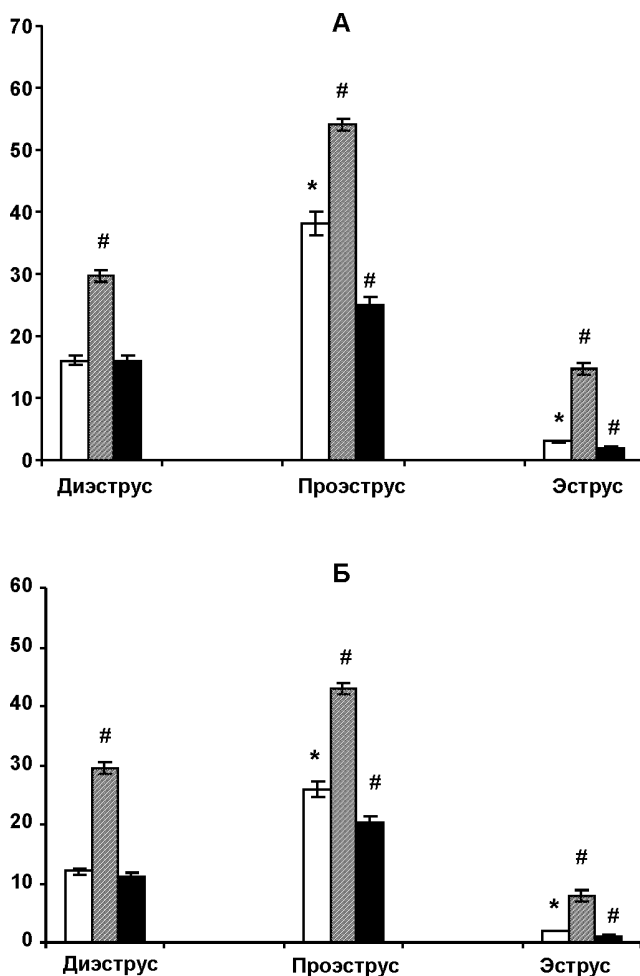


Рис. 2. Влияние хронического введения сульпирида и квинпиrolа на пространственное обучение в водном тесте Морриса на 8-е сут. тестирования у самок крыс:

А — тренировочная сессия; Б — экспериментальная сессия.

По вертикали — латентный период нахождения скрытой платформы (в секундах); по горизонтали — фазы овариального цикла. Остальные обозначения как на рис. 1

13]. Установлено, что многие агонисты дофаминовых рецепторов могут выступать в качестве нестероидных лигандов, которые непосредственно связываются с эстрогеновыми рецепторами [8]. В связи с этим, можно предполагать, что противоположные эффекты квинпиrolа и сульпирида связаны с их разнонаправленным воздействием на эстрогеновые рецепторы.

Таким образом, результаты настоящего исследования свидетельствуют о существенной роли D_2 -типа дофаминовых рецепторов в когнитивных процессах у интактных самок в различные фазы полового цикла.

Список литературы

1. **Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж.П.** Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. — М.: Высшая школа, 1991. — 399 с.
2. **Кириенблат Я.Д.** Практикум по эндокринологии. — М.: Высшая школа, 1969. — 255 с.
3. **Пономарев Д.Б., Виноградова Е.П.** Сравнительный анализ способности к обучению в водном тесте Морриса у крыс, различающихся по скорости выработки условного рефлекса активного избегания // Журн. высш. нерв. деят. — 2000. — Т. 50, №6. — С. 974—981.
4. **Сапронов Н.С., Федотова Ю.О.** Гормоны гипоталамо-гипофизарно-овариальной системы и мозг. — СПб.: Формиздат, 2009. — 592 с.
5. **Федотова Ю.О., Сапронов Н.С.** Эффекты эстрогенов в центральной нервной системе // Усп. Физиолог. Наук. — 2007. — Т. 38. — С. 46—62.
6. **Шабанов П.Д., Лебедев А.А., Мещеров Ш.К.** Дофамин и подкрепляющие системы мозга. — СПб.: Лань, 2002. — 208 с.
7. **Abeliovich Hammond A.R.** Midbrain dopamine neuron differentiation: factors and fates // Developmental Biology. — 2007. — Vol. 304. — P. 447—454.
8. **Dagger M.R., Dutertre W., Smith C.L.** SKF-82958 is a subtype-selective estrogen receptor -alpha agonist that induces functional interactions between ER alpha and AP-1 // J. Biol. Chem. — 2002. — Vol. 277. — P. 1669—1679.
9. **Diaz-Veliz G., Benavides M.S., Butron S., Dussaubat N.** et al. Behavioral effects of dopamine agonists and antagonists: influence of estrous cycle, ovariectomy and estradiol replacement in rats // Pharmacol. Biochem. Behav. — 1999. — Vol. 62. — P. 21—29.
10. **Guillin O., Laruelle M.** Neurobiology of Dopamine in Schizophrenia // Cell. Sci. Rev. — 2005. — Vol. 2. — P. 345—389.
11. **Kimberg D.Y., D'Esposito M.** Cognitive effects of the dopamine receptor agonist pergolide // Neuropsychol. — 2003. — Vol. 41. — P. 1020—1027.
12. **Lammers C.H., De Souza U., Qin Z.H., Lee S.H.** et al. Regulation of striatal dopamine receptors by estrogen // Synapse. — 1999. — Vol. 34. — P. 222—227.
13. **Markou A., Duka T., Prelevic G.M.** Estrogens and brain function // Hormones. — 2005. — Vol. 4. — P. 9—17.

Поступила 22.11.2010

Е.А. Шевченко, О.А. Успенская

Исследование взаимосвязей факторов, способствующих формированию персистенции при урогенитальных инфекциях

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, 603081, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 70

При персистирующей папилломавирусной инфекции (ПВИ) шейки матки достоверно чаще в сравнении с транзиторной встречалось наличие двух и более ИППП. Выявленная активация показателей иммунной системы при ПВИ способствует прекращению дальнейшего развития инфекции в организме, препятствует персистенции вирусов папилломы человека 16 и 18-го типов в организме, предотвращает развитие связанных с ней онкологических заболеваний. Это может способствовать элиминации вируса из организма.

Ключевые слова: урогенитальные инфекции, папилломавирус, персистенция инфекций

E.A. Shevchenko, O.A. Uspenskaya

Research of interrelations of persistence-factors for sexual-transmitted infections

Nizhny Novgorod State Medical Academy, 70, Gagarin ave., Nizhny Novgorod, 603081

Two and more of sexual-transmitted infections present in most quantity of cases with persistent form of infection, then with transitory form of infection. Activation of immune system with papilloma-virus infection do initiality for elimination of virus from organism and stopped next development of infection in organism, development of oncologic diseases, persistent of virus in organism.

Key words: sexual-transmitted ifection, papilloma-virus, persisitent form

Персистенция инфекции является серьезной проблемой при урогенитальной патологии в связи с опасностью развития нарушений репродуктивной функции и онкологических процессов [3, 4]. Диагностика папилломавирусной инфекции (ПВИ), особенно ее латентных форм, не сопровождающихся морфологическими изменениями в тканях, весьма затруднена [5]. Факторы, способствующие длительной персистенции вируса папилломы в организме, в том числе, иммунологические, изучены недостаточно [1, 2].

Цель исследования — выявление иммунологических особенностей, связанных с присутствием в организме женщин вируса папилломы человека 16 и 18-го типов.

Для корреспонденции: Шевченко Елена Александровна, д-р мед. наук, доцент каф. патофизиологии ГБОУ ВПО Нижегородского государственного университета Минздрава России. E-mail: pathphys@gma.nnov.ru

Методика

Обследовано 150 женщин репродуктивного возраста (18—45 лет), обратившихся с целью профилактического обследования, с различными жалобами со стороны урогенитального тракта, наличием доброкачественных заболеваний шейки матки, с бесплодием. Из них практически здоровые женщины (контрольная группа) — 30 чел. Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени исследовали соскобы эпителия из урогенитального тракта на наличие вируса папилломы человека.

Иммунологические исследования проводили методом непрямой иммунофлюоресценции с моноклональными антителами к дифференцированным антигенам лимфоцитов, с помощью иммуноферментного анализа (уровни α -интерферона, сывороточные иммуноглобулины IgA, IgM, IgG). Проводилась кольпоскопия, цитологическое исследование, при необходимости — ультразвуковое исследование органов малого таза.

Статистическая обработка материала проводилась с использованием программного пакета «Stadia» и «Statistika 5.1».

Результаты и обсуждение

У 41% обследованных было выявлено присутствие вирусов папилломы человека высокого онкогенного риска (16-й и 18-й тип), т.е. латентная ПВИ шейки матки. Большинство из них (82%) составляли женщины в возрасте от 19 до 33 лет. Персистирующая ПВИ (трехкратное выявление вирусов папилломы человека с интервалом 3—6 мес) была обнаружена у 38% обследованных, а транзитная (однократное выявление вируса, когда последующие исследования через 3—6 мес дали отрицательные результаты) — у 62%.

Было проанализировано наличие и преобладание тех или иных возбудителей других инфекций, передающихся половым путем, у обследуемых. У 75% женщин с персистирующей латентной и у 67% с транзитной ПВИ были обнаружены возбудители урогенитальных инфекций. При персистирующем течении латентной ПВИ достоверно чаще (28%) имело место инфицирование урогенитального тракта хламидиями. Аналогичная картина наблюдалась и при обследовании на урогенитальную микоплазменную инфекцию: при персистирующем течении 25,6% и при транзитном — 13,7%.

Сходная ситуация наблюдалась и при выявлении инфицированности цитомегаловирусной и герпесвирусной инфекциями. При персистирующей папилломавирусной инфекции цитомегаловирус встречался в 2,4 раза чаще, чем при транзитной. Вирус простого герпеса 2-го типа был обнаружен у 11,2% женщин с латентной ПВИ, в том числе несколько чаще (15,4%) — у обследуемых с персистирующей формой ПВИ.

Кандидоз также встречался достоверно чаще при персистирующем течении (53%), чем при транзитной (18%). Бактериальный вагиноз был обнаружен у 41% женщин с персистирующей ПВИ и у 23% с транзитной. Кроме того, при персистирующей форме чаще (69%), чем при транзитной (37%), выявлялись различные нарушения нормофлоры, в том числе недостаточное количество лактобацилл, преобладание условно-патогенных микроорганизмов. Трихомонадная инфекция и гонорея урогенитального тракта не были обнаружены ни у одного из обследованных.

При наличии микст-инфекций у обследованных вновь подтвердилась выявленная закономерность. При персистирующей ПВИ достоверно чаще (54%), по сравнению с транзитной (29%) встречалось наличие двух и более урогенитальных инфекций. Следует отметить, что учитывались все перечисленные выше урогенитальные инфекции, кроме папилломавирусной.

Для оценки состояния иммунной системы обследуемых изучены естественные факторы защиты, ряд показателей, характеризующих функционирование иммунной системы и состояние цитокинового профиля (интерферон α). Концентрация лизоцима в сыворотке крови оказалась существенно сниженной как при персистирующей, так и при транзитной форме ПВИ.

Как при персистирующей, так и при транзитной форме количество иммунокомпетентных клеток (Т- и В-лимфоцитов) было выше по сравнению с контролем. Было выявлено увеличение количества CD19+ -лимфоцитов, увеличение относительного числа натуральных киллеров (CD16+ -лимфоцитов). Все это свидетельствует об активации иммунной системы у данных пациенток.

Уровень интерферона α сыворотки крови составлял при персистирующей форме $11,9 \pm 2,7$ пкг/мл и в контрольной группе $8,0 \pm 1,9$ пкг/мл, т.е. различия не были статистически значимыми, тогда как при транзитной форме он был существенно выше. Возможно, это могло препятствовать персистенции вирусов папилломы в организме данных пациенток.

При транзитной форме ПВИ нами выявлена также тенденция к увеличению количества сывороточного иммуноглобулина М, что позволяет предположить более высокую реактивность иммунной системы у этих пациенток.

В целом при анализе показателей активации иммунной системы более высокие показатели были выявлены при транзитном течении заболевания. Именно в этой группе пациенток отмечено достоверное повышение относительного числа цитотоксических Т-лимфоцитов CD8+ и Т-лимфоцитов CD3+. При транзитной ПВИ возрастало также число CD3+, CD4+, CD8+, CD16+ -лимфоцитов с характерным перераспределением субпопуляций лимфоцитов в сторону увеличения количества иммунокомпетентных клеток.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что изученные показатели функции иммунной системы являются факторами, способствующими прекращению дальнейшего развития инфекции в организме, предотвращают персистенцию вирусов папилломы человека 16-го и 18-го типов в организме, а значит, и развитие онкологических осложнений. Кроме того, активация иммунной системы позволяет элиминировать вирус папилломы 16-го и 18-го типов из эпителия урогенитального тракта.

На основании вышеизложенного можно говорить о необходимости углубленного изучения анамнеза и обследования полового партнера при выявлении у женщины ПВИ, особенно высокого онкогенного риска. Если у данной пациентки имеются факторы риска

развития персистирующей папилломавирусной инфекции (использование внутриматочных средств контрацепции, отягощенная онкологическая наследственность, воспалительные заболевания органов малого таза, заболевания шейки матки, дисбиоз влагалищной микрофлоры, явные проявления папилломавирусной инфекции) и (или) выявлены другие возбудители урогенитальных инфекций, необходимо провести обследование иммунного статуса. Далее при отсутствии аутоиммунной патологии, других возможных противопоказаний и после анализа состояния иммунной системы пациентки возможно назначение иммуностропных препаратов.

Необходимо не только обследование на папилломавирусную инфекцию высокого онкогенного риска пациенток, но и наблюдение гинеколога. И то, и другое — не реже 1 раза в 4—6 мес., включая кольпоскопию и цитологическое исследование. Для постановки диагноза персистирующей папилломавирусной инфекции необходимо как минимум трехкратное выявление вируса папилломы для подтверждения диагноза и последующего назначения иммуностропных препаратов. Все это необходимо для предотвращения развития или возможно более ранней диагностики рака шейки матки у женщин.

Список литературы

1. *Башмакова М.А., Савичева А.М.* Папилломавирусная инфекция: Пособие для врачей. — М., 2003. (5)
2. *Долгих Т.И., Михайлова Н.А., Гордиенко Т.Г., Воетрина И.Р.* ПЦР-диагностика папилломавирусной инфекции у женщин репродуктивного возраста // Сборник трудов 5-й Всероссийской научно-практической конференции «Генодиагностика инфекционных болезней». Т. 1 / Науч. редактор акад. РАМН В.И. Покровский. 2004 г. 19—21 октября. — М., 2004. — С. 29—31. (3)
3. *Евстигнеева Н.П., Кузнецова Ю.Н., Герасимова Н.М.* Папилломавирусная инфекция у женщин с воспалительными заболеваниями органов малого таза // Сборник трудов 5-й Всероссийской научно-практической конференции «Генодиагностика инфекционных болезней». Т. 1 / Науч. редактор акад. РАМН В.И. Покровский. 2004 г. 19—21 октября. — М., 2004. — С. 31—32. (2)
4. *Ивашков Е.А.* Сравнительная характеристика результатов выявления папилломавирусной инфекции, вызванной ВПЧ 16 и ВПЧ 18 // Сборник трудов 5-й Всероссийской научно-практической конференции «Генодиагностика инфекционных болезней». Т. 1 / Науч. редактор акад. РАМН В.И. Покровский. 2004 г. 19—21 октября. — М., 2004. — С. 33—36. (1)
5. *Critchlow C.W., Koutsky L.A.* Genital Warts. Human Papillomavirus Infection / Ed. A. Mindel. — London, 1995. — P. 53—81. (4)

Поступила 15.09.2010

Сведения об авторах:

Успенская Ольга Александровна, канд. мед. наук, доцент кафедры терапевтической стоматологии ГБОУ ВПО НижГМА Минздравсоцразвития Российской Федерации

С.В. Лямина¹, Ш.Л. Шимшелашвили¹, И.Ю. Малышев^{1,2}

Сурфактантный белок D — эндогенный регулятор воспаления и иммунной защиты

¹ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Московский государственный медико-стоматологический университет»

Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации,

Москва, 127473, Москва, ул. Десятская, 20/1

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Сурфактантный белок D (SP-D) — компонент сурфактанта легких, представитель семейства коллагеноподобных лектинов (коллектинов), играет одну из значимых ролей во врожденном антителонезависимом иммунном ответе. Особенности структуры белка, возможность воздействия SP-D на патогенетические звенья воспалительной реакции, экспрессии медиаторов воспаления и достижения необходимого баланса между контролем выраженности воспалительной реакции и формированием надлежащего ответа на действие патогена позволяют рассматривать SP-D как часть системы врожденного иммунитета легких и эндогенный регулятор течения воспалительных реакций в организме.

Ключевые слова: сурфактантный белок D, иммунный ответ, воспаление

S.V. Lyamina¹, Sh.L. Shimshelashvili¹, I.Yu. Malyshev^{1,2}

Surfactant protein D — endogenous regulator of inflammation and immune defense

¹ Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia, 20/1, Delegatskaya str., Moscow, 127473, Russia

² The Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

Surfactant protein D (SP-D) is a component of lung surfactant, the representative of collagen-like lectines (collectines) family. It plays one of the significant roles in innate antibody-independent immune response. Structural features of SP-D, the possibility of its influence on pathogenetic components of inflammatory reaction, expression of inflammatory mediators and attainment of necessary balance between control of inflammatory reaction intensity and formation of the proper response to pathogens allow to consider SP-D as a part of innate immune system of the lung and endogenous regulator of inflammatory reactions in the organism.

Key words: surfactant protein D, immune response, inflammation

Сурфактантный белок D (surfactant pulmonary associated protein B, SFTPD или SP-D; ген — SFTPD) — один из недавно открытых сурфактант-ассоциированных белков, представитель семейства коллагеноподобных лектинов (коллектинов), играющих одну из значимых ролей во врожденном антителонезависимом иммунном ответе. SP-D является компонентом сурфактанта легких, продуцируемым альвеолярными клетками II типа и нецилиарными клетками бронхиол легких — клетками Клара [7]. Первоначально выделенный из альвеолоцитов II типа

крысы и обозначенный как коллагеновый белок 4 (CP4), сурфактантный белок D впервые был описан как основной сурфактант-ассоциированный белок в 1988 г. [32]. Позднее, в соответствии с принятой номенклатурой, вещество получило название сурфактантного белка D [51, 52]. Белок относится к классу кальций-зависимых лектинов C-типа [57]. Данный класс белков объединяет SP-D с другими известными лектинами с иммуномодулирующими свойствами: сывороточными лектинами, связывающими маннозу, легочным сурфактантным белком A (SP-A), конглоутином — белком телячьей сыворотки и коллектин CL-43, играющими значимую роль во врожденном антителонезависимом иммунном ответе, что позволяет предположить и роль SP-D в иммунной защите организма.

Для корреспонденции: Малышев Игорь Юрьевич, д-р мед. наук, проф., зав. лаб. клеточных биотехнологий НИМСИ, зав. каф. патологической физиологии лечебного факультета ГБОУ ВПО МГМСУ Минздравсоцразвития России, зав. лаб. патофизиологии стресс и адаптации ФГБУ ВПО НИИОПП РАМН. E-mail: igor.malyshev@mtu-net.ru

Синтез белка SP-D кодируется в длинном плече 10 хромосомы, также отвечающей за синтез SP-A и маннозо-связывающего белка (MBP), что свидетельствует о тесной эволюционной взаимосвязи этих белков [16]. В проведенных исследованиях была показана достоверная корреляция уровней мРНК SP-D с количеством белка SP-D, позволяющая предположить, что определяющая часть регуляции контроля за продукцией SP-D осуществляется на уровне транскрипции [18]. Кроме того, установлено, что регуляция продукции SP-D на уровне транскрипции является тканеспецифичной и чувствительной к воздействиям со стороны как клетки, так и окружающей среды, что также подтверждает значимость SP-D для системы врожденного иммунного ответа [26].

Структура SP-D

По результатам проведенных исследований установлено, что SP-D может существовать в различных олигомерных состояниях в форме мономера, тримера, додекамера или мультимера. Мономер белка SP-D имеет молекулярную массу 43 кДа, состоит из 375 аминокислот и включает четыре домена: NH₂-хвостовой домен, коллагеноподобный домен, домен «шейки» и C-концевой лектиновый домен «головка», распознающий COOH-группы углеводов и лектин C-типа [3]. В состав зрелой формы белка SP-D входит 375 аминокислот. Домен, распознающий COOH-группы углеводов, обладает функциями лектинов и участвует в процессе тримеризации, вовлекая также шейный домен. С помощью распознающего COOH-домена сурфактантный белок D связывается с углеводными комплексами на поверхности различных вирусов, бактерий и грибов [17, 36, 55]. Коллагеноподобный домен обеспечивает стабильность и необходимую длину для образования перекрестных связей и агглютинации SP-D белка. Длинная крестообразная структура белка SP-D позволяет осуществлять перекрестное лигирование патогенов, связывающихся с C-концевым доменом, что ведет к их агрегации, агглютинации и облегчению процесса фагоцитоза. Такая агрегационная способность SP-D зависит от коллагеноподобного домена [25], а также валентности, тропности к углеводам и пространственной конформации C-концевого домена [18, 23]. NH₂-хвостовой домен участвует в формировании дисульфидных мостиков для мультимеризации более высокого порядка и обеспечивает взаимодействие с клетками в случае «занятости» C-концевого домена.

Наиболее простой функциональной единицей белка является тример, состоящий из трех переплетающихся мономеров,шитых дисульфидными мостиками. В легких человека в норме SP-D существует преимущественно в форме додекамеров и мультимеров с единичными тримерами [15, 23].

Роль SP-D

в поддержании гомеостаза в легких в норме

Приблизительно 10% легочного сурфактанта составляют белки сурфактанта, среди которых преобладает SP-A. Концентрация SP-D достигает 1/3 от концентрации SP-A [23], что обуславливает количество белка <600 нг/мл до 1 мкг/мл (63 мкг/мл после вычисления с учетом фактора разведения) в легких человека или до 3 мкг/мл в легких крысы [28, 64]. Несмотря на столь низкие концентрации, SP-D — чрезвычайно важный белок, обеспечивающий поддержание необходимого гомеостаза в легких. Показано, что у мышей, лишенных гена SP-D, отмечено выраженное поражение легких: богатые липидами пенистые, активированные макрофаги; гипертрофия альвеолоцитов II типа; накопление липидов сурфактанта и изменение структуры фосфолипидов [35]; разрастание перибронхиальной лимфоидной ткани, клинически и морфологически — прогрессирующая эмфизема [53]. Представленные данные указывают на важность и необходимость наличия SP-D для сохранения и поддержания нормальной функции легких, а также гомеостаза сурфактанта легких.

Характерная деструкция эластина у мышей, не имеющих гена SP-D, свидетельствует о роли SP-D в предотвращении разрушения стенок альвеол литическими ферментами, такими, как матриксные металлопротеиназы (MMP), а также оксидантами [72, 73]. Кроме того, SP-D также важен для поддержания физиологической структуры легких и захвата сурфактанта альвеолоцитами II типа и альвеолярными макрофагами (AM) [30].

Значимость SP-D заключается и в способности облегчать процесс фагоцитоза уже погибших клеток, обеспечивая нормальное разрешение воспаления [21].

Таким образом, SP-D выполняет важную функцию по поддержанию гомеостаза в легких частично с помощью регуляции постоянства состава сурфактанта и контроля течения воспалительного процесса.

Влияние SP-D на функцию альвеолярных макрофагов и микроокружение в легких

В норме в легких альвеолярные макрофаги постоянно контактируют с сурфактантом легких, в том числе и с SP-D. Взаимодействуя с макрофагами компоненты сурфактанта могут изменять фенотип клеток, влияя на экспрессию поверхностных макрофагальных рецепторов. Известно, что SP-D непосредственно взаимодействует с AM [21], хотя четкие определяющие факторы этого взаимодействия сложны и до сих пор полностью не изучены. В настоящее время считается, что SP-D — важный белок, принимающий участие в контроле активации макрофагов и экспрессии медиаторов воспаления. Являясь компонентом микроокружения макрофагов в легких, SP-D представляет собой также и один из ключевых регуляторов их активности. Установлено, что

SP-D не только регулирует баланс макрофагальных цитокинов Th1 и Th2 профиля [2], но и вовлечен в регуляцию стресс-ответа макрофагов [1].

В ряде исследований, у мышей, нокаутных по SP-D (лишенных гена SP-D), показана большая выраженность легочного воспаления, увеличение продукции оксидантов, усиление активации NF-κB [14] и увеличение продукции MMP [72]. При предварительной обработке SP-D моноцитов крови отмечено снижение воспалительной продукции оксида азота (NO) [40], а также общее снижение липополисахарид (LPS)-индуцированной продукции воспалительных цитокинов альвеолярными макрофагами [21]. Также SP-D влияет на снижение продукции NO после стимуляции LPS или аллергенами [21, 40] и снижает фагоцитарный потенциал AM [66].

В исследованиях последних лет было показано [20, 60, 61], что SP-D, взаимодействуя с AM, способен изменять экспрессию поверхностных макрофагальных рецепторов, тем самым изменяя функцию клетки и, возможно, выступая в качестве репрограммирующего фактора макрофагов [4]. В AM нокаутных по SP-D мышей отмечена меньшая экспрессия мембранного белка CD14, маркера зрелых макрофагов, участвующего в распознавании компонента бактериальной стенки — липополисахарида, что, предположительно, связано с увеличением уровня локальных MMP 9 и 12 в отсутствие SP-D [60]. В других исследованиях было показано, что SP-D может стабилизировать и предотвращать разрушение CD11c [61] (трансмембранный белок I типа, способствующий активации клеток и запуску окислительного взрыва нейтрофилов), а также увеличивать поверхностную экспрессию этого рецептора на макрофагах [20]. Кроме того, SP-D способствует продукции кислородных радикалов альвеолярными макрофагами [67]. Также SP-D участвует в контроле выраженности воспалительных реакций в легких за счет снижения оксидации липидов в высокоокислительной среде легких [10], снижая продукцию TNFα [29], презентацию MHCII CD11c-позитивными клетками в легких [22] и продукцию IL-2 T-клетками [11]. Кроме того, SP-D способствует изменению экспрессии поверхностных рецепторов макрофагов, таких, как β1 интегрины и маннозный рецептор (MR) [61], участвующих в распознавании и фагоцитозе патогенов. Фактически, многие патогены, с углеводными комплексами которые связываются SP-D, подвергаются усиленному фагоцитозу альвеолярными макрофагами — например, *Klebsiella pneumoniae* [34, 47], *Pseudomonas aeruginosa* [56], *Haemophilus influenzae* [36], *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* [65], респираторно-сенцитиальный вирус [39], *Aspergillus fumigatus* [42]. SP-D в этом случае выступает в качестве триггера запуска провоспалительного ответа. Установлена способность C-концевого домена, распознающего углеводы, человеческого SP-D преимущественно распознавать мальтозу > маннозу, тогда как

родственные белки данного класса (например, MBR, конглоутин и т.д.) преимущественно связываются с маннозой [41, 48].

Возможность запуска иммунного ответа про- либо противовоспалительной направленности при действии SP-D [21], т.е. двойственность иммунного ответа, в настоящее время объясняется мультифункциональной структурой белка [21]. Современные исследования показали, что олигомеризация SP-D является ключевым моментом в регуляции воспалительного ответа в легких [74]. Кроме того, установлено, что разные олигомерные формы SP-D альтернативно влияют на активность и функции альвеолярных макрофагов [21]. Это связано с тем, что мультимеры и додекамеры SP-D взаимодействуют с одним типом рецепторов на поверхности альвеолярных макрофагов, тогда как S-нитрозилированные тримеры — с другим типом рецепторов [21].

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о непосредственном влиянии SP-D на функции альвеолярных макрофагов и значимой роли SP-D в контроле баланса про- и противовоспалительных звеньев иммунного ответа организма.

Рецепторы SP-D

SP-D взаимодействует с альвеолярными макрофагами, способствуя поддержанию баланса между контролем выраженности воспаления и формированием соответствующего ответа на взаимодействие с опасными патогенами.

В работе Hansen с соавторами [22] применение SP-D у клеток RAW 264.7 (клеточная линия мышечных макрофагов) приводило к увеличению фосфорилирования SIRPα, миелидного трансмембранного рецептора, ингибирующего внутриклеточный сигналинг, что указывает на взаимодействие или тесную взаимосвязь между белком SP-D и данным рецептором. Данная работа подтверждает наличие дуального взаимодействия легочных коллектинов с альвеолярными макрофагами. Связывание глобулярного C-концевого домена с макрофагом в физиологическом состоянии запускает каскад событий, ведущих к подавлению провоспалительного иммунного ответа и активации противовоспалительного звена. В то же время, в случае «занятости» C-концевого домена (например, связыванием с патогеном) N-концы и коллагеноподобные области SP-D взаимодействуют с рецепторным комплексом CD91/кальретикунин, комплементарным рецептором (C1q), что ведет к активации провоспалительного ответа [21].

Необходимость взаимодействия SP-D с рецепторным комплексом CD91/кальретикунин представляет исключительный интерес для понимания провоспалительного действия SP-D. Дело в том, что кальретикунин — это внутриклеточный стресс белок, который локализуется в просвете эндоплазматического ретикулума [62]. В нормальных условиях кальретикунин не выходит из клеток.

Он попадает в экстраклеточное пространство, когда происходит повреждение клеток, вызванное, например, бактериальной инфекцией. Это означает, что для SP-D-зависимой индукции воспаления необходимо совпадение двух обстоятельств. Первое — переход SP-D в мономерную или тримерную форму. Такой переход могут вызвать патогенные бактерии, компоненты которых способны связываться с головкой SP-D. Однако такой переход могут вызвать также и непатогенные бактерии. А в этом случае нет необходимости запускать воспалительную реакцию, которая может повредить ткань легких. Поэтому второе обстоятельство — это выход из клетки кальретикулина — сигнала о реальном повреждении клеток. Такой двухстадийный контроль имеет большое значение — он гарантирует легкие от случайного запуска воспаления.

В дальнейших исследованиях было показано, что SP-D связывается с рецепторным комплексом CD91/кальретикулин при определенных условиях: условиях связывания SP-D с апоптотическими клетками [66] или в присутствии значимых концентраций ЭДТА [45], указывающих на связывание, не зависящее от C-концевого домена. В ходе исследований, выполненных S.-F. Kuan с соавторами [37], была показана возможность связывания SP-D с макрофагами как посредством C-концевого домена (на его долю приходится около 80% связывания с макрофагами в физиологических условиях [37], так и независимо от него. В других исследованиях были представлены данные о взаимодействии между SP-D и многочисленными поверхностными клеточными рецепторами, включая CD91/кальретикулин [21, 66], SIRP-а [21], MD-2 [46], CD-14 [58], TLR4 [49], TLR2 [49] и gp340 (ассоциированный с альвеолярными макрофагами растворимый белок семейства фагоцитарных рецепторов макрофагов) [27] и белок, ассоциированный с микрофибриллами человека [38]. Также существуют косвенные данные о возможности связывания в физиологических условиях SP-D с SIRP α [21]. Сигнальный регуляторный белок α (SIRP α) — высокогликозилированный белок, выявленный на поверхности макрофагов и ассоциированный с ингибированием клеточного сигналинга [13]. SP-D приводит к фосфорилированию SIRP α и активации SHP, ассоциированного сигнального ингибирующего белка, блокирующего внутриклеточный сигналинг через взаимодействие с src-семейством киназ и MAPK p38 (митогенактивированной протеинкиназой p38), приводя к подавлению провоспалительного ответа.

Важной группой рецепторов, взаимодействующих с SP-D, является рецепторный комплекс ЛПС, включающий TLR4 [49], MD2 [46] и CD14 [58]. В отсутствие SP-D свободные ЛПС связываются с ЛПС-связывающим белком (LBP), который, наряду с CD14, презентует ЛПС ассоциированным с клетками TLR4 и MD2 [12]. Взаимодействия SP-D с

данными рецепторами способствуют подавлению провоспалительного ответа [58], препятствуя нормальному связыванию с ЛПС (или другим лигандом), тем самым обеспечивая механизм протективного действия белка против эндотоксического шока [31].

В физиологических условиях любой из указанных рецепторов может принимать участие в связывании SP-D с макрофагами человека. В настоящее время проводятся дальнейшие исследования по изучению макрофагальных рецепторов для связывания с SP-D, что будет способствовать дальнейшему пониманию механизма регуляции гомеостаза и иммунорегуляторной роли данного белка при его взаимодействии с макрофагами, а также роли SP-D в патогенезе заболеваний.

Роль SP-D в иммунной защите организма

По имеющимся на сегодняшний день данным, SP-D — белок с иммуномодулирующими свойствами, обладающий антимикробным действием против многочисленных легочных патогенов [33]. Взаимодействие SP-D с микроорганизмами часто опосредуется через присоединение его C-концевого домена, распознающего углеводы, к микробным полисахаридам [50].

Ранее иммунорегуляторная роль SP-D предполагалась, исходя из принадлежности белка к классу лектинов C-типа и определенного сходства в последовательностях и структуре SP-D с другими представителями данного класса, обладающими функциями антимикробной иммунной защиты организма, например, конглоутина. Впоследствии была показана возможность связывания SP-D с LPS, компонентом клеточной стенки грамм-отрицательных бактерий и основной причиной развития эндотоксического шока, что позволяло рассценивать белок как вещество — иммуномодулятор [36]. Установлено, что SP-D связывается со значительным числом Грамм-отрицательных бактерий, приводя к их агглютинации [17, 36]. С тех пор выявлено множество бактерий, грибов и вирусов, достоверно взаимодействующих с SP-D, с развитием различных биологических ответов [34, 39, 42—44, 47, 54, 56, 65, 68]. Таким образом, в настоящее время SP-D рассматривается как уже известное вещество, играющее значимую роль в иммунной защите организма, усиливающее агрегацию патогенов и процесс фагоцитоза, также снижающее выживаемость патогенов и в то же время снижающее выраженность воспалительного ответа организма, тем самым защищая чувствительные дыхательные пути.

SP-D выполняет важную роль в защите организма от инфекции за счет связывания с патогенами, что часто приводит к усилению фагоцитоза и активации основных клеток системы врожденного иммунитета — макрофагов. Кроме того, SP-D-опсонизированные патогены также способствуют развитию протективного, провоспалительного цитокинового ответа со стороны макрофагов [34, 47].

С другой стороны, SP-D можно рассматривать как вещество, снижающее интенсивность воспаления за счет усиления фагоцитоза апоптотических клеток, регуляции продукции цитокинов и свободных радикалов в легких [21, 66]. В частности, SP-D контролирует экспрессию в легких таких классических провоспалительных цитокинов, как TNF α , [29], IL-1 β [30], IL-6 [32] и IL-8 [59], при этом увеличивая уровень IL-10 [63], цитокина, для которого, как правило, характерно подавление провоспалительного ответа [8]. В физиологических условиях, SP-D играет важную роль в поддержании нормальной функции легких за счет регуляции воспаления. Это доказано наличием значительного повреждения легких и подверженностью инфекциям легких, что отмечается у мышей, лишенных гена SP-D [73], тогда как мыши с чрезмерной экспрессией SP-D (уровень белка в легких превышен в 30—50 раз) демонстрируют снижение воспаления [19]. Установлено, что альвеолярные макрофаги мышей, не имеющих гена SP-D, продуцируют больше H₂O₂ и матриксных металлопротеиназ благодаря NF- κ B, что указывает на активацию макрофагов [73]. Эта способность SP-D проявлять свойства бивалентного фактора — провоспалительного и противовоспалительного, может быть объяснена взаимодействием различных доменов белка с макрофагами. В большинстве случаев более простые формы, такие, как тримеры, демонстрируют более узкий диапазон биологической активности против патогенов по сравнению с мультимерами и додекамерами, а также снижение способности к агрегации [25].

Таким образом, SP-D эффективно функционирует как часть системы иммунной защиты организма против микроорганизмов. Во-первых, SP-D обладает защитными свойствами против Грамм-отрицательных бактерий. SP-D снижает жизнеспособность бактерий за счет связывания и непосредственно пермеабиллизации (повышения проницаемости) мембраны бактериальной стенки [70]. Связывание и пермеабиллизация вариabельны [69], что объясняют едва различимыми вариациями в структуре ЛПС, изменяющими связывающую способность SP-D [36]. Кроме бактерий, SP-D также взаимодействует с макрофагальным рецепторным комплексом к ЛПС — CD14, TLR4 и MD2 [71]. Предположительно, блокирование взаимодействия ЛПС с этими рецепторами является механизмом, с помощью которого SP-D препятствует развитию эндотоксемии в экспериментальных моделях у животных. Во-вторых, SP-D обладает защитными свойствами против вирусных инфекций, таких, как грипп [54]. С-концевой домен SP-D связывается с фрагментами гемагглютинина и нейраминидазы на поверхности вируса гриппа, что способствует подавлению активности вируса и его инфективности [24]. В-третьих, SP-D обладает защитной функцией против грибковых патогенов, например, при инвазивном бронхопульмональном аспергиллезе [43]. SP-D связывается с конидиями

аспергилл, способствуя агрегации грибков и увеличивая в итоге выживаемость организма [6].

Однако имеются и другие данные, определяющие роль SP-D при ряде заболеваний легких. По существу, SP-D не всегда обеспечивает защиту организма при легочных заболеваниях. Например, при действии *Pneumocystis carinii*, дрожжеподобного грибка, являющегося легочным патогеном, живущим в воздухоносном пространстве альвеол [9], отмечено существенное снижение активности процесса фагоцитоза, что защищает грибок от внутриклеточного разрушения клетками врожденного иммунитета. *Pseudomonas aeruginosa*, *Dermatophagoides pteronyssinus* и *D. farina* (последние — пылевые клещи) вырабатывают литические ферменты, вызывающие деградацию и деактивацию SP-D [5]. В связи с этим, данная проблема требует дальнейшего изучения и, несмотря на несколько приведенных примеров, SP-D можно рассматривать как эффективный белок иммунной защиты организма.

Заключение

Таким образом, влияние сурфактантного белка D (SP-D) на поддержание гомеостаза в легких, а также возможность воздействия белка на патогенетические звенья воспалительной реакции с помощью контроля активации альвеолярных макрофагов, экспрессии медиаторов воспаления и достижения необходимого баланса между контролем выраженности воспалительной реакции и формированием надлежащего ответа на действие патогена позволяют рассматривать SP-D как часть системы врожденного иммунитета легких и эндогенный регулятор течения воспалительных реакций.

Список литературы

1. *Вассерман Е.Н., Абрамова Е.В., Круглов С.В.* и др. Отсутствие гена SP-D приводит к усилению ЛПС-индуцированного синтеза HSP70 в M2, но не в M1 фенотипе перитонеальных макрофагов: возможная роль интерлейкина-10 // *Фундаментальные исследования*. — 2010. — №6. — С. 19—27.
2. *Вассерман Е.Н., Лямина С.В., Шмидлашвили Ш.Л.* с соавторами. SP-D контролирует баланс Th1 и Th2 цитокинов и обладает признаками эндогенного фактора репрограммирования макрофагов // *Фундаментальные исследования*. — 2010. — №6. — С. 28—36.
3. *Лямина С.В., Круглов С.В., Веденикин Т.Ю., Малышев И.Ю.* Новая стратегия управления иммунным ответом при заболеваниях легких — роль сурфактантного белка D как бивалентного фактора репрограммирования макрофагов // *Фундаментальные исследования*. — 2011. — №1. — С. 90—98.
4. *Малышев И.Ю., Лямина С.В., Шмидлашвили Ш.Л., Вассерман Е.Н.* Функциональные ответы альвеолярных макрофагов, сурфактантный белок D и заболевания легких // *Пульмонология*. — 2011. — №3. — С. 101—107.
5. *Alcorn J.F., Wright J.R.* Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function // *J. Biol. Chem.* — 2004. — Vol. 279. — P. 30871—30879.
6. *Allen M.J., Harbeck R., Smith B.* et al. Binding of rat and human surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia // *Infect. Immun.* — 1999. — Vol. 67. — P. 4563—4569.

7. **Atochina E.N., Beers M.F., Hawgood S.** et al. Surfactant protein-D, a mediator of innate lung immunity, alters the products of nitric oxide metabolism // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* — 2004. — Vol. 30. — P. 271–279.
8. **Bazzoni F., Tamassia N., Rossato M., Cassatella M.A.** Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted IL-10-mediated anti-inflammatory response: lessons from neutrophils // *Eur. J. Immunol.* — 2010. — Vol. 40. — P. 2360–2368.
9. **Bleiweiss I.J., Jagirdar J.S., Klein M.J.** et al. Granulomatous Pneumocystis carinii pneumonia in three patients with the acquired immune deficiency syndrome // *Chest.* — 1988. — Vol. 94. — P. 580–583.
10. **Bridges J.P., Davis H.W., Damodarasamy M.** et al. Pulmonary surfactant proteins A and D are potent endogenous inhibitors of lipid peroxidation and oxidative cellular injury // *J. Biol. Chem.* — 2000. — Vol. 275. — P. 38848–38855.
11. **Brinker K.G., Martin E., Borron P.** et al. Surfactant protein D enhances bacterial antigen presentation by bone marrow-derived dendritic cells // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* — 2001. — Vol. 281. — P. L1453–L1463.
12. **Buer J., Balling R.** Mice, microbes and models of infection // *Nat. Rev. Genet.* — 2003. — Vol. 4. — P. 195–205.
13. **Cant C.A., Ullrich A.** Signal regulation by family conspiracy // *Cell Mol. Life Sci.* — 2001. — Vol. 58. — P. 117–124.
14. **Clark H., Palaniyar N., Strong P.** et al. Surfactant protein D reduces alveolar macrophage apoptosis *in vivo* // *J. Immunol.* — 2002. — Vol. 169. — P. 2892–2899.
15. **Crouch E., Persson A., Chang D.** Accumulation of surfactant protein D in human pulmonary alveolar proteinosis // *Am. J. Pathol.* — 1993. — Vol. 142. — P. 241–248.
16. **Crouch E., Rust K., Veile R.** et al. Genomic organization of human surfactant protein D (SP-D). SP-D is encoded on chromosome 10q22.2-23.1 // *J. Biol. Chem.* — 1993. — Vol. 268. — P. 2976–2983.
17. **Crouch E., Chang D., Rust K.** et al. Recombinant pulmonary surfactant protein D. Post-translational modification and molecular assembly // *J. Biol. Chem.* 1994. — Vol. 269. — P. 15808–15813.
18. **Dulkerian S.J., Gonzales L.W., Ning Y., Ballard P.L.** Regulation of surfactant protein D in human fetal lung // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* — 1996. — Vol. 15. — P. 781–786.
19. **Fisher J.H., Sheftelyevich V., Ho Y.S.** et al. Pulmonary-specific expression of SP-D corrects pulmonary lipid accumulation in SP-D gene-targeted mice // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* — 2000. — Vol. 278. — P. L365–L373.
20. **Guth A.M., Janssen W.J., Bosio C.M.** et al. Lung environment determines unique phenotype of alveolar macrophages // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* — 2009. — Vol. 296. — P. L936–L946.
21. **Gardai S.J., Xiao Y.Q., Dickinson M.** et al. By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation // *Cell.* — 2003. — Vol. 115. — P. 13–23.
22. **Hansen S., Lo B., Evans K.** et al. Surfactant protein D augments bacterial association but attenuates major histocompatibility complex class II presentation of bacterial antigens // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* — 2007. — Vol. 36. — P. 94–102.
23. **Hartshorn K., Chang D., Rust K.** et al. Interactions of recombinant human pulmonary surfactant protein D and SP-D multimers with influenza A // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* — 1996. — Vol. 271. — P. L753–L762.
24. **Hartshorn K.L., White M.R., Voelker D.R.** et al. Mechanism of binding of surfactant protein D to influenza A viruses: importance of binding to haemagglutinin to antiviral activity // *Biochem. J.* — 2000. — Vol. 351(Pt 2). — P. 449–458.
25. **Hartshorn K.L., White M.R., Crouch E.C.** Contributions of the N- and C-terminal domains of surfactant protein D to the binding, aggregation, and phagocytic uptake of bacteria // *Infect. Immun.* — 2002. — Vol. 70. — P. 6129–6139.
26. **He Y., Crouch E.C., Rust K.** et al. Proximal promoter of the surfactant protein D gene: regulatory roles of AP-1, forkhead box, and GT box binding proteins // *J. Biol. Chem.* — 2000. — Vol. 275. — P. 31051–31060.
27. **Holmskov U., Lawson P., Teisner B.** et al. Isolation and characterization of a new member of the scavenger receptor superfamily, glycoprotein-340 (gp-340), as a lung surfactant protein-D binding molecule // *J. Biol. Chem.* — 1997. — Vol. 272. — P. 13743–13749.
28. **Honda Y., Takahashi H., Kuroki Y.** et al. Decreased contents of surfactant proteins A and D in BAL fluids of healthy smokers // *Chest.* — 1996. — Vol. 109. — P. 1006–1009.
29. **Hortobagyi L., Kierstein S., Krytska K.** et al. Surfactant protein D inhibits TNF-alpha production by macrophages and dendritic cells in mice // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2008. — Vol. 122. — P. 521–528.
30. **Ikegami M., Na C.L., Korfhagen T.R., Whitsett J.A.** Surfactant protein D influences surfactant ultrastructure and uptake by alveolar type II cells // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* — 2005. — Vol. 288. — P. L552–L561.
31. **Ikegami M., Carter K., Bishop K.** et al. Intratracheal recombinant surfactant protein D prevents endotoxin shock in the newborn preterm lamb // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2006. — Vol. 173. — P. 1342–1347.
32. **Jain D., Atochina-Vasserman E.N., Tomer Y.** et al. Surfactant protein D protects against acute hyperoxic lung injury // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2008. — Vol. 178. — P. 805–813.
33. **Kishore U., Greenhough T.J., Waters P.** et al. Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors // *Mol. Immunol.* — 2006. — Vol. 43. — P. 1293–1315.
34. **Kostina E., Ofek I., Crouch E.** et al. Noncapsulated *Klebsiella pneumoniae* bearing mannose-containing O antigens is rapidly eradicated from mouse lung and triggers cytokine production by macrophages following opsonization with surfactant protein D // *Infect. Immun.* — 2005. — Vol. 73. — P. 8282–8290.
35. **Korfhagen T.R., Sheftelyevich V., Burhans M.S.** et al. Surfactant protein D regulates surfactant phospholipid homeostasis *in vivo* // *The Journal of Biological Chemistry.* — 1998. — Vol. 273, №43. — P. 28438–28443.
36. **Kuan S.-F., Rust K., Crouch E.** Interactions of surfactant protein D with bacterial lipopolysaccharides: surfactant protein D is an *Escherichia coli*-binding protein in bronchoalveolar lavage // *J. Clin. Invest.* — 1992. — Vol. 90. — P. 97–106.
37. **Kuan S.-F., Persson A., Parghi D., Crouch E.** ectin-mediated interactions of surfactant protein D with alveolar macrophages // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* — 1994. — Vol. 10. — P. 430–436.
38. **Lausen M., Lynch N., Schlosser A.** et al. Microfibril-associated protein 4 is present in lung washings and binds to the collagen region of lung surfactant protein D // *J. Biol. Chem.* — 1999. — Vol. 274. — P. 32234–32240.
39. **LeVine A.M., Elliott J., Whitsett J.A.** et al. Surfactant protein-d enhances phagocytosis and pulmonary clearance of respiratory syncytial virus // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* — 1004. — Vol. 31. — P. 193–199.
40. **Liu C.F., Chen Y.L., Shieh C.C.** et al. Therapeutic effect of surfactant protein D in allergic inflammation of mite-sensitized mice // *Clin. Exp. Allergy.* — 2005. — Vol. 35. — P. 515–521.
41. **Lu J., Willis A.C., Reid K.B.M.** Purification, characterization and cDNA cloning of human lung surfactant protein D // *Biochem. J.* — 1994. — Vol. 284. — P. 795–802.
42. **Madan T., Eggleton P., Kishore U.** et al. Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages // *Infect. Immun.* — 1997. — Vol. 65. — P. 3171–3179.
43. **Madan T., Kishore U., Singh M.** et al. Surfactant proteins A and D protect mice against pulmonary hypersensitivity induced by *Aspergillus fumigatus* antigens and allergens // *J. Clin. Invest.* — 2001. — Vol. 107. — P. 467–475.
44. **Meschi J., Crouch E.C., Skolnik P.** et al. Surfactant protein D binds to human immunodeficiency virus (HIV) envelope protein gp120 and inhibits HIV replication // *J. Gen. Virol.* — 2005. — Vol. 86. — P. 3097–3107.
45. **Miyamura K., Leigh L.E.A., Lu J.** et al. Surfactant protein D binding to alveolar macrophages // *Biochem. J.* — 1994. — Vol. 300. — P. 237–242.

46. Nie X., Nishitani C., Yamazoe M. et al. Pulmonary surfactant protein D binds MD-2 through the carbohydrate recognition domain // *Biochemistry*. — 2008. — Vol. 47. — P. 12878–12885.
47. Ofek I., Mesika A., Kalina M. et al. Surfactant protein D enhances phagocytosis and killing of unencapsulated phase variants of *Klebsiella pneumoniae* // *Infect. Immun.* — 2001. — Vol. 69. — P. 24–33.
48. Ogasawara Y., Voelker D.R. Altered carbohydrate recognition specificity engineered into surfactant protein D reveals different binding mechanisms for phosphatidylinositol and glucosylceramide // *J. Biol. Chem.* — 1995. — Vol. 270. — P. 14725–14732.
49. Ohya M., Nishitani C., Sano H. et al. Human pulmonary surfactant protein D binds the extracellular domains of Toll-like receptors 2 and 4 through the carbohydrate recognition domain by a mechanism different from its binding to phosphatidylinositol and lipopolysaccharide // *Biochemistry*. — 2006. — Vol. 45. — P. 8657–8664.
50. Palaniyar N., Nadesalingam J., Clark H. et al. Nucleic acid is a novel ligand for innate, immune pattern recognition collectins surfactant proteins A and D and mannose-binding lectin // *J. Biol. Chem.* — 2004. — Vol. 279. — P. 32728–32736.
51. Persson A., Rust K., Chang D. et al. CP4: a phenocyte-derived collagenous surfactant-associated protein: evidence for heterogeneity of collagenous surfactant proteins // *Biochemistry*. — 1998. — Vol. 27. — P. 8576–8584.
52. Persson A., Chang D., Rust K. et al. Purification and biochemical characterization of CP4 (SP-D), a collagenous surfactant-associated protein // *Biochemistry*. — 1989. — Vol. 28. — P. 6361–6367.
53. Postle A.D., Mander A., Reid K.B. et al. Deficient hydrophilic lung surfactant proteins A and D with normal surfactant phospholipid molecular species in cystic fibrosis // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* — 1999. — Vol. 20. — P. 90–98.
54. Reading P.C., Holmskov U., Anders E.M. Antiviral activity of bovine collectins against rotaviruses // *J. Gen. Virol.* — 1998. — Vol. 79 (Pt 9). — P. 2255–2263.
55. Reid K.B.M. Interactions of surfactant protein D with pathogens, allergens and phagocytes // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Molecular Basis of Disease*. — 1998. — Vol. 1408. — Issues 2–3. — P. 290–295.
56. Restrepo C.I., Dong Q., Savov J. et al. Surfactant protein D stimulates phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by alveolar macrophages // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* — 1999. — Vol. 21. — P. 576–585.
57. Rust K., Grosso L., Zan V. et al. Human surfactant protein D: SP-D contains a C-type lectin carbohydrate binding domain // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1991. — Vol. 290. — P. 116–125.
58. Sano H., Chiba H., Iwaki D. et al. Surfactant proteins A and D bind CD14 by different mechanisms // *J. Biol. Chem.* — 2000. — Vol. 275. — P. 22442–22451.
59. Sato A., Whitsett J.A., Scheule R.K. et al. Surfactant protein-d inhibits lung inflammation caused by ventilation in premature newborn lambs // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2010. — Vol. 181. — P. 1098–1105.
60. Senft A.P., Korfhagen T.R., Whitsett J.A., Shapiro S.D., LeVine A.M. Surfactant protein-D regulates soluble CD14 through matrix metalloproteinase-12 // *J. Immunol.* — 2005. — Vol. 174. — P. 4953–4959.
61. Senft A.P., Korfhagen T.R., Whitsett J.A., LeVine A.M. Surfactant protein D regulates the cell surface expression of alveolar macrophage beta(2)-integrins // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* — 2007. — Vol. 292. — P. L469–L475.
62. Somogui E., Petersson U., Hyltenby K., Wendel M. Calreticulin — an endoplasmic reticulum protein with calcium-binding activity is also found in the extracellular matrix // *Matrix Biol.* — 2003. — Vol. 22(2). — P. 179–191.
63. Takeda K., Miyahara N., Rha Y.H. et al. Surfactant protein D regulates airway function and allergic inflammation through modulation of macrophage function // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2003. — Vol. 168. — P. 783–789.
64. Tino M.J., Wright J.R. Surfactant proteins A and D specifically stimulate directed actin-based responses in alveolar macrophages // *Am. J. Physiol.* — 1999. — Vol. 276. — P. L164–L174.
65. Van de Wetering J.K., Van Eijk M., Van Golde L.M.G. et al. Characteristics of surfactant protein A and D binding to lipoteichoic acid and peptidoglycan, 2 major cell wall components of gram-positive bacteria // *J. Infect. Dis.* — 2001. — Vol. 184. — P. 1143–1151.
66. Vandivier R.W., Ogden C.A., Fadok V.A. et al. Role of surfactant proteins A, D, and Clq in the clearance of apoptotic cells *in vivo* and *in vitro*: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex // *J. Immunol.* — 2002. — Vol. 169. — P. 3978–3986.
67. Van Iwaarden J.F., Shimizu H., Van Golde P.H.M. et al. Rat surfactant protein D enhances the production of oxygen radicals by rat alveolar macrophages // *Biochem. J.* — 1992. — Vol. 286. — P. 5–8.
68. Van Rozenaal B.A., Van Spruiel A.B., Van De Winkel J.G., Haagsman H.P. Role of pulmonary surfactant protein D in innate defense against *Candida albicans* // *J. Infect. Dis.* — 2000. — Vol. 182. — P. 917–922.
69. Wang H., Head J., Kosma P. et al. Recognition of heptoses and the inner core of bacterial lipopolysaccharides by surfactant protein d // *Biochemistry*. — 2008. — Vol. 47. — P. 710–720.
70. Wu H., Kuzmenko A., Wan S. et al. Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability // *J. Clin. Invest.* — 2003. — Vol. 111. — P. 1589–1602.
71. Yamazoe M., Nishitani C., Takahashi M. et al. Pulmonary surfactant protein D inhibits lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory cell responses by altering LPS binding to its receptors // *J. Biol. Chem.* — 2008. — Vol. 283. — P. 35878–35888.
72. Yoshida M., Korfhagen T.R., Whitsett J.A. Surfactant protein D regulates NF-kappa B and matrix metalloproteinase production in alveolar macrophages via oxidant-sensitive pathways // *J. Immunol.* — 2001. — Vol. 166. — P. 7514–7519.
73. Yoshida M., Whitsett J.A. Alveolar macrophages and emphysema in surfactant protein-D-deficient mice // *Respirology*. — 2006. — 11. — Suppl. — S37–S40.
74. Zhang L., Ikegami M., Crouch E.C. et al. Activity of pulmonary surfactant protein-D (SP-D) *in vivo* is dependent on oligomeric structure // *J. Biol. Chem.* — 2001. — Vol. 276 (22). — P. 19214–19219.

Поступила 07.09.2011

Сведения об авторах:

Лямина Светлана Владимировна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. клеточных биотехнологий, ГБОУ ВПО МГМСУ Минздравсоцразвития России

Шалва Леович Шимшелашвили, канд. мед. наук, асс. каф. госпитальной терапевтической стоматологии, пародонтологии и гериатрической стоматологии, ГБОУ ВПО МГМСУ Минздравсоцразвития России

Л.Н. Маслов¹, И.Г. Халиулин², Ю.К. Подоксёнов¹

Нейропротекторный и кардиопротекторный эффекты гипотермического preconditionирования

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт кардиологии»

Сибирского отделения РАМН, Томск, 634012, ул. Киевская, 111а

² Университет Бристолья, Бристоль, Великобритания, Bristol, BS8 1TD, UK

Данные литературы свидетельствуют, что существует раннее и позднее гипотермическое preconditionирование головного мозга. Нейропротекторный эффект раннего гипотермического preconditionирования является следствием активации аденозиновых A1 рецепторов, КАТФ-каналов, белка Ras и определяется уменьшением синтеза NO. Инфаркт-лимитирующий эффект отсроченного гипотермического preconditionирования мозга зависит от синтеза белков de novo. Представленные данные свидетельствуют о том, что гипотермическое preconditionирование препятствует некрозу кардиомиоцитов в ответ на ишемию-реперфузию, улучшает насосную функцию сердца в реперфузионном периоде, оказывает антиаритмический эффект. Гипотермическое preconditionирование оказывает более выраженный кардиопротекторный эффект по сравнению с ишемическим preconditionированием. Защитное действие температурного preconditionирования связано с активацией протеинкиназы C, AMP-activated protein kinase (AMPK) и ингибированием MPT-поры. Активные формы кислорода являются триггерами или медиаторами гипотермического preconditionирования сердца.

Ключевые слова: гипотермическое preconditionирование, головной мозг, сердце

L.N. Maslov¹, I.G. Khaliulin², Yu.K. Podoksenov¹

Neuroprotective and cardioprotective effects of hypothermic preconditioning

¹ Institute of Cardiology, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Science, 634012 111, Kyevskaia str., Tomsk, Russia

² University of Bristol, University Walk, Bristol, BS8 1TD UK

The literature data testify the there is an early and delayed hypothermic preconditioning of brain. Neuroprotective effect of early hypothermic preconditioning is a result of activation of adenosine A1 receptors, KATP-channels. Ras protein and predetermined by a decrease in the synthesis of NO. The infarct-sparing effect of delayed hypothermic preconditioning of brain is depended upon protein synthesis de novo. The presented data demonstrate that hypothermic preconditioning prevents cardiomyocyte necrosis in response to ischemia-reperfusion, improves pump function of the heart during reperfusion period, exerts an antiarrhythmic effect. The hypothermic preconditioning exerts more pronounced cardioprotective effect than ischemic preconditioning. The protective impact of hypothermic preconditioning is depended upon activation of protein kinase C, AMP-activated protein kinase (AMPK) and inhibition of MPT pore. The reactive oxygen species are triggers and mediators of hypothermic preconditioning of heart.

Key words: hypothermic preconditioning, brain, heart

Общеизвестно, что ишемические и реперфузионные повреждения лежат в основе патогенеза инсульта, острого инфаркта миокарда. Они же являются частой причиной реперфузионной сократительной дисфункции сердца после выполнения кардиохирургических вмешательств с использованием искусственного кровообращения. Ишемические и реперфузионные повреждения сердца налагают временные ограничения на эффективность пересадки донорского органа.

Неудивительно, что у исследователей вызывают огромный интерес адаптивные феномены, обеспечивающие повышение толерантности органов и тканей к ишемическим и реперфузионным повреждениям. Наиболее изученным является феномен ишемического preconditionирования (ИП) сердца и головного мозга. Суть феномена сводится к тому, что мозг после одного сеанса кратковременной ишемии (2 мин) и реперфузии (2 мин) становится устойчивым к действию длительной ишемии [9, 10], для адаптации сердца требуется более длительная ишемия (3—10 мин) и реперфузия (3—10 мин) [14, 20]. К сожалению, феномен ИП обладает некоторыми побочными эффек-

Для корреспонденции: Маслов Леонид Николаевич, д-р мед. наук, проф., рук. лаборатории экспериментальной кардиологии, НИИ Кардиологии СО РАМН. E-mail: maslov@cardio.tsu.ru

тами, например, 5-минутная коронароокклюзия и реперфузия может вызывать появление таких жизнеугрожающих аритмий, как желудочковая тахикардия и фибрилляция [12, 19]. Прекодиционирование может провоцировать появление реперфузионной сократительной дисфункции сердца [13, 15]. Подобные побочные эффекты вносят определенные ограничения на возможность применения ИП в клинической практике и побуждают исследователей искать адаптивные феномены, не оказывающие негативные эффекты на сердце и головной мозг.

Исследователи решили использовать в качестве прекодиционирующего воздействия кратковременную гипотермию [8, 17, 18, 28]. В связи с этим следует отметить, что длительная гипотермия оказывает нейропротекторный, кардиопротекторный эффект и используется в клинической практике [2, 7, 23, 24].

В 1999 г. группа американских физиологов во главе с проф. K.S. Lee [17] для прекодиционирования головного мозга крыс предложила использовать 20-минутную гипотермию (от $+31^{\circ}\text{C}$ до $+32^{\circ}\text{C}$). Для этого крыс наркотизировали галотаном и обкладывали пакетами со льдом, через 30 мин ректальная температура снижалась до $+31^{\circ}\text{C}$ [17, 18]. После 20-минутной гипотермии тело животных нагревали с помощью лампы [18]. Общая продолжительность гипотермии составляла около 80 мин. Авторы назвали подобную кратковременную гипотермию гипотермическим прекодиционированием (ГП) [18]. Транзиторную фокальную ишемию воспроизводили с помощью 1-часовой окклюзии обеих сонных артерий и средней мозговой артерии. Инфаркт мозга моделировали через 6 ч, 24 ч, 2 дня и 7 дней после умеренной гипотермии ($+31,5^{\circ}\text{C}$). Инфаркт-лимитирующий эффект был зафиксирован через 6 ч, 24 ч, 2 дня после ГП, но не через 7 дней после ГП. Наиболее выраженное уменьшение (в 2 раза) размеров зоны некроза было выявлено через сутки после гипотермии [17, 18]. Через сутки после умеренной гипотермии ($+28,5^{\circ}\text{C}$) было обнаружено уменьшение объема инфаркта в 1,5 раза [18]. Эти данные свидетельствуют, что прекодиционирование с помощью мягкой гипотермии ($+31,5^{\circ}\text{C}$) оказывает более выраженный нейропротекторный эффект по сравнению с ГП с помощью умеренной гипотермии ($+28,5^{\circ}\text{C}$). Кроме того, представленные факты говорят о существовании отсроченного (позднего) ГП мозга. В 2002 г. тот же коллектив исследователей [28] попытался сопоставить эффективность нескольких моделей ГП. В первой серии использовали гипотермию ($+31,5^{\circ}\text{C}$, $+28,5^{\circ}\text{C}$, $+25,5^{\circ}\text{C}$) продолжительностью 20 мин (общая продолжительность охлаждения организма составила 80 мин), интервал до транзиторной фокальной ишемии (1 ч) был равен 20 мин. Оказалось, что мягкая

гипотермия ($+31,5^{\circ}\text{C}$) вызывала уменьшение объема инфаркта в 1,5 раза, а после умеренной гипотермии ($+28,5^{\circ}\text{C}$, $+25,5^{\circ}\text{C}$) размер очага некроза уменьшался в 2 раза. Следовательно, существует феномен не только позднего, но и раннего ГП мозга, при котором более выраженный нейропротекторный эффект оказывает умеренная гипотермия. Какого-либо усиления инфаркт-лимитирующего эффекта ГП при снижении температуры с $+28,5^{\circ}\text{C}$ до $+25,5^{\circ}\text{C}$ авторам обнаружить не удалось. В следующей серии они использовали снижение температуры тела до $+28,5^{\circ}\text{C}$, постгипотермический интервал составлял 20, 60 и 120 мин. В случае, если постгипотермический интервал был равен 20 и 60 мин, размер зоны некроза после транзиторной ишемии уменьшался в 2 раза, а через 2 ч после ГП повышения толерантности мозга к ишемии выявить не удалось [29]. Следовательно, феномен раннего ГП мозга сходен с феноменом раннего ИП сердца, для которого характерно исчезновение кардиопротекторного эффекта ИП через 3 ч после транзиторной коронароокклюзии [25]. В отдельной серии экспериментов M. Yunoki с соавторами [28] показали, что локальное охлаждение головы животного на 20 мин до температуры коры мозга в $+28,5^{\circ}\text{C}$ или $+31,5^{\circ}\text{C}$ оказывает такой же ранний нейропротекторный эффект, как и охлаждение целого тела. Этот факт говорит о том, что в нейропротекторном эффекте ГП ключевую роль играют события, происходящие на уровне головного мозга. В 2004 г. американские физиологи [26], выполняя эксперименты на срезах мозжечка, показали, что снижение температуры до $+33^{\circ}\text{C}$ на 20 мин предупреждает гибель клеток Пуркиньи после удаления из среды инкубации глюкозы и кислорода на 20 мин. Следовательно, раннее ГП удается воспроизвести в экспериментах *in vitro*.

Исследователи из США попытались выяснить, зависит ли нейропротекторный эффект ГП от синтеза белков *de novo* [18]. Оказалось, что блокада синтеза белка с помощью анизомицина полностью устраняет инфаркт-лимитирующий эффект позднего ГП [18]. В то же время анизомицин не влиял на нейропротекторный эффект раннего ГП [18]. Эти факты говорят о том, что молекулярные механизмы раннего и позднего ГП различны. Раннее прекодиционирование не нуждается в синтезе белков *de novo*, в то время как синтез белков *de novo* является обязательным условием для реализации защитного эффекта отсроченного прекодиционирования. Природа названных белков остается не известной. В более поздней работе те же исследователи [27] показали, что эти белки не относятся к белкам теплового шока (HSP, heat shock proteins), поскольку ГП не влияло на экспрессию HSP-70. В 2004 г. Y.B. Yuan с соавторами [26], выполняя эксперименты

на срезах мозжечка, установили, что нейропротекторный эффект раннего ГП *in vitro* зависит от активации аденозиновых A_1 рецепторов, АТФ-чувствительных K^+ -каналов (K_{ATP} -каналов) и ГТФ-связывающего белка Ras. Известно, что радикал оксида азота (NO) в малых концентрациях оказывает цитопротекторный, а в больших концентрациях — цитотоксический эффект [1]. Американские физиологи предположили, что нейропротекторный эффект ГП связан с ограничением продукции NO [27]. В опытах на срезах мозжечка они показали, что тестирующая аноксия (удаление из среды инкубации глюкозы и кислорода на 20 мин) приводит к гибели нейронов и усилению S-нитрозилирования белков [27], подобное нитрозилирование, как известно, является следствием избыточной продукции NO [1]. В этих экспериментах ГП предупреждало гибель нейронов и снижало нитрозилирование белков. Ингибитор индуцибельной NO-синтазы аминогуанидин предупреждал гибель нейронов в результате аноксии [27]. Эти результаты позволили авторам утверждать [27], что нейропротекторный эффект раннего ГП связан с ограничением синтеза NO индуцибельной NO-синтазой.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют, что существует раннее и позднее гипотермическое прекондиционирование головного мозга.

Нейропротекторный эффект раннего гипотермического прекондиционирования является следствием активации A_1 рецепторов, K_{ATP} -каналов, белка Ras и определяется уменьшением синтеза NO. Инфаркт-лимитирующий эффект отсроченного гипотермического прекондиционирования зависит от синтеза белков *de novo*.

Весной 2007 г. британские физиологи [8] опубликовали данные о кардиопротекторном эффекте гипотермического прекондиционирования. В своей статье они использовали термин «температурное прекондиционирование» [8]. В работе речь шла о воздействии на изолированное сердце чередования пониженной температуры ($+26^\circ\text{C}$) и нормальной температуры ($+37^\circ\text{C}$). В контрольной группе изолированное перфузируемое сердце крысы подвергали воздействию 25-минутной глобальной ишемии с последующей реперфузией в течение 60 мин. В группе ишемического прекондиционирования при $+37^\circ\text{C}$ на сердце воздействовали тремя циклами глобальной ишемии (2 мин) и реперфузии (3 мин), с последующим моделированием 25-минутной ишемии. В группе температурного прекондиционирования сердце подвергали воздействию трёх циклов гипотермии ($+26^\circ\text{C}$) и нормотермии ($+37^\circ\text{C}$) с последующей 25-минутной ишемией. В следующей серии сердца подвергали воздействию однократной 6-минутной гипотермии ($+26^\circ\text{C}$) перед 25-минутной ишемией. Некроз кардиомиоцитов оценивали по уровню лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в пер-

фузионном растворе, оттекающем от сердца. Ишемическое прекондиционирование снижало реперфузионный выброс ЛДГ на 60% по сравнению с контролем, ГП уменьшало этот показатель на 73%, а однократное воздействие гипотермии не влияло на уровень ЛДГ [8]. Ишемическое и температурное прекондиционирование снижали частоту возникновения реперфузионных желудочковых аритмий, ГП оказывало более выраженный антиаритмический эффект, чем ИП. В группе контроля реперфузионное давление, развиваемое левым желудочком (ДРЛЖ), составляло 35% от исходной величины (до ишемии). В группе ИП этот показатель составлял 62%, после гипотермического прекондиционирования ДРЛЖ восстанавливалось до 99% от исходной величины, а после однократной гипотермии и реперфузии ДРЛЖ составляло 69% от показателя до ишемии [8]. Ишемическое прекондиционирование ускоряло возникновение контрактуры сердца во время 25-минутной ишемии, в то время как температурное прекондиционирование, напротив, замедляло возникновение контрактуры. В группе ИП и ГП после 60-минутной реперфузии уровень креатинфосфата и АТФ был достоверно выше по сравнению с контролем. Достоверной разницы между гипотермическим и ишемическим прекондиционированием по уровню АТФ и креатинфосфата в реперфузионном периоде выявить не удалось [8]. Интенсивность окислительного стресса оценивали по количеству карбонильных групп в белках, используя метод, предложенный E. Shacter [21]. Оказалось, что ишемическое и температурное прекондиционирование в реперфузионном периоде снижает уровень карбонильных групп в белках сердца, при этом гипотермическое прекондиционирование оказывало достоверно более выраженный антиоксидантный эффект по сравнению с группой ишемического прекондиционирования [8]. Представленные данные свидетельствуют о том, что по своим защитным эффектам термическое и ишемическое прекондиционирование во многом сходны. Однако гипотермическое прекондиционирование оказывает более выраженный цитопротекторный, инотропный, антиаритмический, антиоксидантный эффект по сравнению с ишемическим прекондиционированием. Однократное воздействие гипотермии (6 мин) в реперфузионном периоде оказывает положительный инотропный эффект, но не предупреждает некроз кардиомиоцитов. Следовательно, для повышения толерантности кардиомиоцитов к действию ишемии-реперфузии необходимо чередование гипотермической перфузии с нормотермической перфузией. Следует отметить, что ишемическое прекондиционирование ускоряло возникновение контрактуры, а температурное прекондиционирование замедляло формирование контрактуры серд-

ца. Ишемическая контрактура главным образом зависит от уровня АТФ в миокарде [22], поэтому задержка развития контрактуры является косвенным подтверждением энергосберегающего эффекта температурного прекондиционирования, который способствует ограничению окислительного стресса во время реперфузии. В то же время интенсивный расход энергетических запасов до начала длительной ишемии у сердца с ишемическим прекондиционированием включает иной кардиозащитный эффект. Так, Н.Р. Cross et al. [3] показали, что ИП вызывает снижение уровня гликогена в миокарде. Это способствует уменьшению интенсивности анаэробного гликолиза во время длительной ишемии и, следовательно, ограничению накопления лактата и ионов водорода. В результате — меньшее снижение внутриклеточного рН, что приводит к меньшему компенсаторному накоплению натрия и кальция в миокарде. Между тем известно, что чрезмерное накопление внутриклеточного кальция во время ишемии является одним из главных повреждающих факторов при реперфузии [5]. Эти факты косвенно свидетельствуют о том, что сигнальный механизм ИП и ГП может быть различен.

В 2007 г. физиологи из Кувейта [4] опубликовали результаты своих экспериментов, выполненных на изолированных перфузируемых сердцах крыс, которые подвергали 60-минутной глобальной ишемии при $+34^{\circ}\text{C}$ и реперфузии (30 мин при $+34^{\circ}\text{C}$). Ишемическое прекондиционирование моделировали с помощью двух циклов ишемии (5 мин) и реперфузии (10 мин при $+34^{\circ}\text{C}$). Во время транзитной ишемии сердце помещали в изотонический раствор, охлажденный или нагретый до нужной температуры. Использовали следующий диапазон температур: $+10^{\circ}\text{C}$, $+20^{\circ}\text{C}$, $+30^{\circ}\text{C}$, $+34^{\circ}\text{C}$, $+37^{\circ}\text{C}$, $+40^{\circ}\text{C}$, $+42^{\circ}\text{C}$ [4]. Кардиопротекторный эффект ИП оценивали по восстановлению ДРЛЖ и снижению конечного диастолического давления (КДД) в реперфузионном периоде. Вазопротекторный эффект ИП оценивали по величине коронарного протока во время реперфузии. Оказалось, что транзитная гипертермия усиливала кардиопротекторный и вазопротекторный эффект ишемического прекондиционирования. Сочетание 5-минутной ишемии и гипотермии приводило к ослаблению защитного эффекта ИП. Температурная зависимость кардиопротекторного и вазопротекторного эффекта ишемического прекондиционирования была представлена следующим образом: ИП и $+42^{\circ}\text{C}$ > ИП и $+40^{\circ}\text{C}$ > ИП и $+37^{\circ}\text{C}$ > ИП и $+34^{\circ}\text{C}$ > ИП и $+30^{\circ}\text{C}$ > ИП и $+20^{\circ}\text{C}$ > ИП и $+10^{\circ}\text{C}$ [4]. К сожалению, авторы публикации не исследовали эффект транзитной гипертермии или гипотермии без ишемического прекондиционирования на устойчивость сердца к глобальной ишемии и реперфузии. Ис-

ходя из данных британских физиологов, следовало ожидать, что сочетание транзитной ишемии и гипотермии приведет к усилению толерантности сердца к ишемии-реперфузии по сравнению с нормотермическим ($+37^{\circ}\text{C}$) прекондиционированием. Однако на практике сочетание ишемии и гипотермии привело к ослаблению защитного эффекта прекондиционирования. Возможно, что гипотермия снижает энергетические потребности кардиомиоцитов во время ишемии и тем самым уменьшает гидролиз АТФ с образованием аденозина, последний, как известно [25], является триггером ишемического прекондиционирования. Следовательно, есть основания предполагать, что триггерный механизм гипотермического и ишемического прекондиционирования может быть различен.

Известно, что в сигнальном механизме ишемического прекондиционирования важную роль играют активные формы кислорода (АФК), протеинкиназа С (ПКС) [25], AMP-activated protein kinase (АМРК) [16] и mitochondrial permeability transition pore (МРТ-пора) [25]. Указанная пора является надмолекулярным комплексом, состоящим из нескольких белков, интегрированных во внешнюю и внутреннюю мембрану митохондрий [11]. Открытие этих пор ведет к разобщению окислительного фосфорилирования и выходу из митохондрий цитохрома С и белка АIF (apoptosis-inducing factor) [11], которые катализируют превращение неактивной прокаспазы-9 в активную каспазу-9. Последняя катализирует превращение прокаспазы-3 в каспазу-3, что в конечном итоге ведет к апоптозу. Британские физиологи установили, что добавление в раствор, которым перфузировали изолированное сердце, хелеритрина (ингибитор ПКС) полностью устраняло цитопротекторный эффект ишемического и гипотермического прекондиционирования [8]. Хелеритрин полностью устранял улучшение насосной функции изолированного сердца в реперфузионном периоде после ГП, но не влиял на положительный инотропный эффект ишемического прекондиционирования во время реперфузии. Авторы обнаружили, что температурное прекондиционирование вызывает транслокацию изофермента ПКСε из цитозоля в мембраны кардиомиоцитов [8], что принято рассматривать как признак активации фермента [25]. При ишемическом прекондиционировании подобной транслокации выявить не удалось. Эти данные говорят о том, что в реализации антинекротического эффекта ишемического и гипотермического прекондиционирования задействована ПКС. В то же время ПКС не участвует в положительном инотропном эффекте ишемического прекондиционирования. Эксперименты с ПКСε свидетельствуют о том, что в антинекротическом эффекте ГИ и ПК могут быть задействованы разные изоферменты ПКС. Добавление

в перфузионный раствор антиоксиданта N-(2-меркаптопропионил)глицина (2-МППГ) во время термического preconditionирования полностью устраняло цитопротекторный эффект ГП. Сам 2-МППГ также снижал реперфузионный выброс ЛДГ из миокарда. Названный антиоксидант не влиял на насосную функцию изолированного сердца, но полностью устранял положительный инотропный эффект гипотермического preconditionирования [8], но при этом не влиял на замедление формирования ишемической контрактуры под действием ГП. Эти факты говорят о том, что АФК могут быть триггером или медиатором температурного preconditionирования. Ингибитор АМРК дорзоморфин не влиял на уменьшение реперфузионного выброса ЛДГ из сердца после ишемического preconditionирования и даже усиливал положительный инотропный эффект ИП во время реперфузии. В случае температурного preconditionирования ситуация была прямо противоположной. Дорзоморфин устранял цитопротекторный эффект транзиторной гипотермии, ослаблял, но не устранял положительный инотропный эффект ГП. Фосфорилирование киназ принято расценивать как признак активации фермента [25], поэтому британские исследователи попытались выяснить, как скажется ишемическое и термическое preconditionирование на количестве фосфорилированной АМРК. Результат оказался несколько неожиданным. Ишемическое preconditionирование вызывало увеличение количества фосфорилированной АМРК, а транзиторная гипотермия не оказывала подобного эффекта [8]. Следовательно, при гипотермическом preconditionировании «включается» механизм активации АМРК, отличный от фосфорилирования. Как известно, в реализации кардиопротекторного эффекта ИП важную роль играет МРТ-пора [25], если она закрыта, то вероятность реперфузионного повреждения сердца существенно снижается [6]. Состояние МРТ-поры оценивали по устойчивости к Ca^{2+} -нагрузке митохондрий, изолированных из сердца на третьей минуте реперфузии [8]. В группе контроля (ишемия-реперфузия без preconditionирования) кальций вызывал быстрое набухание митохондрий, а в митохондриях, выделенных из preconditionированных сердец, скорость набухания названных органелл была в 2 раза ниже, чем в контроле. После температурного preconditionирования этот показатель был в 4 раза ниже по сравнению с контролем. Эти данные говорят о том, что кардиопротекторный эффект гипотермического preconditionирования может быть следствием блокады МРТ-поры во время реперфузии сердца.

Представленные данные свидетельствуют о том, что гипотермическое preconditionирование препятствует некрозу кардиомиоцитов в ответ на ише-

мию-реперфузию, улучшает насосную функцию сердца в реперфузионном периоде, оказывает антиаритмический эффект. Защитное действие температурного preconditionирования связано с активацией ПКС, АМРК и ингибированием МРТ-поры. Активные формы кислорода являются триггерами или медиаторами гипотермического preconditionирования.

Таким образом, гипотермическое preconditionирование является высокоэффективным методом защиты головного мозга и сердца от ишемических и реперфузионных повреждений. Обращает на себя внимание тот факт, что гипотермическое preconditionирование оказывает более выраженный кардиопротекторный эффект по сравнению с ишемическим preconditionированием. Следовательно, изучение молекулярной природы гипотермического preconditionирования позволит разработать высокоэффективный метод защиты сердца от ишемических и реперфузионных повреждений. Анализ данных литературы показывает, что многие вопросы остаются без ответа. Так, например, неизвестно, может ли гипотермическое preconditionирование *in vivo* оказывать кардиопротекторный эффект. Нет данных о роли протеинкиназ в нейропротекторном эффекте транзиторной гипотермии. Неизвестно, что является триггером кардиопротекторного эффекта температурного preconditionирования. Неясен вклад K_{ATP} -каналов в защиту сердца от ишемических и реперфузионных повреждений после гипотермического preconditionирования. Эти и ряд других вопросов ещё ждут своего ответа.

Материалы подготовлены при поддержке РФФИ (грант 10-04-00288-а) и Федерального агентства по науке и инновациям (контракт 02.740.11.0714).

Авторы выражают признательность за техническую помощь в подготовке статьи Данильченко Н.А., Бадзиунасу Г., Ключарёву В., Хохловой И.С., Томашевскому А. и Сидорову Р.А.

Список литературы

1. **Зенков Н.К., Лапкин В.З., Меньщикова Е.Б.** Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. — М.: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001.
2. **Bernard S.A., Gray T.W., Buist M.D.** et al. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia // *New England Journal of Medicine*. — 2002. — Vol. 346, №8. — P. 557–563.
3. **Cross H.R., Opie L.H., Radda G.K., Clarke K.** Is a high glycogen content beneficial or detrimental to the ischemic rat heart? A controversy resolved // *Circulation Research*. — 1996. — Vol. 78, №3. — P. 482–491.
4. **Ghadhanfar E.A., Juggi J.S.** Effect of preconditioning temperature on cardioprotection during global ischemia-reperfusion in the rat heart // *Experimental and Clinical Cardiology*. — 2007. — Vol. 12, №1. — P. 11–16.

5. **Halestrap A.P., Clarke S.J., Khaliulin I.** The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 2007. — Vol. 1767, №8. — P. 1007—1031.
6. **Halestrap A.P.** A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection // *Biochemical Society Transaction*. — 2010. — Vol. 38, №4. — P. 841—860.
7. **Kanemoto S., Matsubara M., Noma M.** et al. Mild hypothermia to limit myocardial ischemia-reperfusion injury: importance of timing // *The Annals of Thoracic Surgery*. — 2009. — Vol. 87, №1. — P. 157—163.
8. **Khaliulin I., Clarke S.J., Lin H.** et al. Temperature preconditioning of isolated rat hearts — a potent cardioprotective mechanism involving a reduction in oxidative stress and inhibition of the mitochondrial permeability transition pore // *Journal of Physiology*. — 2007. — Vol. 581, №3. — P. 1147—1161.
9. **Kitagawa K., Matsumoto M., Tagaya M.** et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain // *Brain Research*. — 1990. — Vol. 528, №1. — P. 21—24.
10. **Kitagawa K., Matsumoto M., Kuwabara K.** et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon detected in various brain regions // *Brain Research*. — 1991. — Vol. 561, №2. — P. 203—211.
11. **Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C.** Mitochondrial membrane permeabilization in cell death // *Physiological Review*. — 2007. — Vol. 87, №1. — P. 99—163.
12. **Lu H.R., Yang P., Remeysen P.** et al. Ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in anaesthetized rats: a role of Na^+ and Ca^{2+} influx // *European Journal of Pharmacology*. — 1999. — Vol. 365, №2-3. — P. 233—239.
13. **Matsuda M., Catena T.G., Vander Heide R.S.** et al. Cardiac protection by ischaemic preconditioning is not mediated by myocardial stunning // *Cardiovascular Research*. — 1993. — Vol. 27, №4. — P. 585—592.
14. **Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A.** Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium // *Circulation*. — 1986. — Vol. 74, №5. — P. 1124—1136.
15. **Murry C.E., Richard V.J., Jennings R.B., Reimer K.A.** Myocardial protection is lost before contractile function recovers from ischemic preconditioning // *American Journal of Physiology*. — 1991. — Vol. 260, №3. — P. H796—H804.
16. **Nishino Y., Miura T., Miki T.** et al. Ischemic preconditioning activates AMPK in a PKC-dependent manner and induces GLUT4 up-regulation in the late phase of cardioprotection // *Cardiovascular Research*. — 2004. — Vol. 61, №3. — P. 610—619.
17. **Nishio S., Chen Z.F., Yunoki M.** et al. Hypothermia-induced ischemic tolerance // *Annals of the New York Academy of Sciences*. — 1999. — Vol. 890. — P. 26—41.
18. **Nishio S., Yunoki M., Chen Z.F.** et al. Ischemic tolerance in the rat neocortex following hypothermic preconditioning // *Journal of Neurosurgery*. — 2000. — Vol. 93, №5. — P. 845—851.
19. **Sakamoto J., Miura T., Tsuchida A.** et al. Reperfusion arrhythmias in the murine heart: their characteristics and alteration after ischemic preconditioning // *Basic Research in Cardiology*. — 1999. — Vol. 94, №6. — P. 489—495.
20. **Schulz R., Post H., Vahlhaus G., Heusch G.** Ischemic preconditioning in pigs: a graded phenomenon. Its relation to adenosine and bradykinin // *Circulation*. — 1998. — Vol. 98, №10. — P. 1022—1029.
21. **Shacter E.** Protein oxidative damage // *Methods in Enzymology*. — 2000. — Vol. 319. — P. 428—436.
22. **Swartz D.R., Zhang D., Yancey K.W.** Cross bridge-dependent activation of contraction in cardiac myofibrils at low pH // *American Journal of Physiology*. — 1999. — Vol. 276, №5. — P. H1460—H1467.
23. The Hypothermia After Cardiac Arrest Study Group. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest // *New England Journal of Medicine*. — 2002. — Vol. 346, №8. — P. 549—556.
24. **Theodorsson A., Holm L., Theodorsson E.** Hypothermia-induced increase in galanin concentrations and ischemic neuroprotection in the rat brain // *Neuropeptides*. — 2008. — Vol. 42, №1. — P. 79—87.
25. **Yellon D.M., Downey J.M.** Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology // *Physiological Review*. — 2003. — Vol. 83, №4. — P. 1113—1151.
26. **Yuan H.B., Huang Y., Zheng S., Zuo Z.** Hypothermic preconditioning increases survival of Purkinje neurons in rat cerebellar slices after an *in vitro* simulated ischemia // *Anesthesiology*. — 2004. — Vol. 100, №2. — P. 331—337.
27. **Yuan H.B., Huang Y., Zheng S., Zuo Z.** Hypothermic preconditioning reduces Purkinje cell death possibly by preventing the over-expression of inducible nitric oxide synthase in rat cerebellar slices after an *in vitro* simulated ischemia // *Neuroscience*. — 2006. — Vol. 142, №2. — P. 381—389.
28. **Yunoki M., Nishio S., Ukita N.** et al. Characteristics of hypothermic preconditioning influencing the induction of delayed ischemic tolerance // *Journal of Neurosurgery*. — 2002. — Vol. 97, №3. — P. 650—657.
29. **Yunoki M., Nishio S., Ukita N.** et al. Hypothermic preconditioning induces rapid tolerance to focal ischemic injury in the rat // *Experimental Neurology*. — 2003. — Vol. 181, №2. — P. 291—300.

Поступила 02.09.2010

Сведения об авторах:

Халиулин Игорь Германович, науч. сотр;

Подоксёнов Юрий Кириллович, д-р мед. наук, зав. отд-нием анестезиологии-реанимации НИИ кардиологии СО РАМН