

**ПОЧТОВЫЙ АДРЕС:**

125315, Москва, ул. Балтийская, 8.  
Федеральное государственное  
бюджетное учреждение  
«НИИ Общей патологии и патофизиологии»  
Российской академии медицинских наук  
Редакция журнала  
«Патологическая физиология  
и экспериментальная терапия».  
Home page: www.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 рецензируе-  
мых научных журналов и изданий,  
рекомендованных ВАК России для пуб-  
ликации значимых результатов диссертаци-  
он на соискание ученой степени доктор-  
а и кандидата наук.

Журнал «Патологическая физиология и  
экспериментальная терапия» индексиру-  
ется 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: genius-media@mail.ru

ISSN 0031-2991  
Патологическая физиология и  
экспериментальная терапия.  
2012. №3. 1–83.

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

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

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

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

# **ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ**

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

**№3, 2012**  
**ИЮЛЬ—СЕНТЯБРЬ**

## **РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ**

**Главный редактор Б.Б. Мороз**

**Ю.В. Архипенко, Е.И. Асташкин, С.В. Грачев,  
Н.С. Гурко (ответственный секретарь), Т.А. Гуськова,  
И.С. Гушин (зам. главного редактора), А.В. Ефремов,  
В.Б. Кошелев, Н.А. Крупина, А.А. Кубатиев,  
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

<b>Самойлов М.О., Рыбникова Е.А., Чурилова А.В.</b> Сигнальные молекулярные и гормональные механизмы формирования протективных эффектов гипоксического preconditionирования . . . . .	3
<b>Семенов Д.Г., Беляков А.В., Глущенко Т.С., Самойлов М.О.</b> Участие метаболитных глутаматных рецепторов мозга в механизмах гипоксической сигнализации. . . . .	11
<b>Белослудцев К.Н., Миронова Г.Д.</b> Митохондриальная липидная пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированная пора и её возможная роль в деградации нервных клеток . . . . .	20
<b>Медникова Ю.С., Кожечкин С.Н., Копытова Ф.В., Коштойанц О.Х.</b> Приспособительная функция мозга и проблемы гипоксии . . . . .	33
<b>Мальшев И.Ю., Круглов С.В., Лямина С.В.</b> Гипоксия, воспаление и фенотипическая пластичность макрофагов: центральная роль HIF-1 и NFkB . . . . .	42

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<b>Кирова Ю.И.</b> Влияние гипоксии на динамику содержания HIF-1 $\alpha$ в коре головного мозга и формирование адаптации у крыс с различной резистентностью к гипоксии . . . . .	51
<b>Круглов С.В., Бахтина Л.Ю., Калиш С.В., Мальшева Е.В., Буданова О.П., Манухина Е.Б., Ларионов Н.П., Мальшев И.Ю.</b> Устойчивость к острой гипоксии и изменение фенотипа и фенотипической пластичности макрофагов мышей разных генетических линий . . . . .	56
<b>Романова Г.А., Шакова Ф.М., Давыдова Т.В.</b> Сравнение нейропротективного действия антител к глутамату и лекарственного препарата семакса при очаговом ишемическом повреждении префронтальной коры головного мозга крыс. . . . .	62
<b>Родионов А.Н., Лобанов А.В., Морозов С.Г., Сидякин А.А., Аникина О.М., Грибова И.Е., Рыбаков А.С., Проценко А.Н., Мурашев А.Н., Ключник Т.П.</b> Влияние высокого уровня антител к ФРН в раннем эмбриогенезе на формирование поведения мышей в постнатальном периоде развития . . . . .	68
<b>Козловский В.Л.</b> Оценка влияния галоперидола на изменение реакции развития спонтанной катаlepsии при субхроническом введении агонистов и антагонистов дофаминергической передачи. . . . .	75
<b>Игнашкова Т.И., Меситов М.В., Рыбаков А.С., Московцев А.А., Соколовская А.А., Кубатиев А.А.</b> Депонирование фактора Виллебранда в эндотелиальных клетках человека HUVEC в условиях стресса эндоплазматического ретикула, индуцированного избытком гомоцистеина, <i>in vitro</i> . . . . .	81
<b>Меситов М.В., Игнашкова Т.И., Мешерский М.Е., Акопов А.С., Соколовская А.А., Московцев А.А., Кубатиев А.А.</b> Индукция стресса эндоплазматического ретикула в условиях окислительно-восстановительного дисбаланса в клетках Т-лимфобластной лейкемии человека . . . . .	87
<b>Лебедева М.А., Богачев В.Ю., Терновой К.С., Никушкина Н.Е., Карганов М.Ю.</b> Сердечная патология и вегетативные нарушения у пациентов с позвоночно-спинномозговой травмой . . . . .	94
<b>Собенин И.А., Карагодин В.П., Мельниченко А.А., Орехов А.Н.</b> Холестерин циркулирующих иммунных комплексов как индикатор атеросклероза . . . . .	99
<b>Мясоедова В.А., Кириченко Т.В., Орехова В.А., Собенин И.А., Мухамедова Н.М., Мартиросян Д.М., Карагодин В.П., Орехов А.Н.</b> Изучение толщины интимо-медиадного слоя сонных артерий (ТИМ) как показателя естественного течения атеросклероза в московской популяции . . . . .	104
<b>Боброва Н.А., Микитюк М.В., Куценко Л.А., Кайдашев И.П.</b> Влияние фуллерена $\text{C}_{60}$ на процессы свободнорадикального окисления липидов при экспериментальной бронхиальной астме. . . . .	109

## ОБЗОРЫ

<b>Иванова М.М., Бородачев Е.Н., Сазонова М.А.</b> Заболевания человека, ассоциированные с мутациями митохондриального генома . . . . .	115
<b>Желанкин А.В., Сазонова М.А.</b> Ассоциация мутаций митохондриального генома человека с хроническими заболеваниями невоспалительного генеза: сахарным диабетом 2-го типа, артериальной гипертензией и различными видами кардиомиопатии . . . . .	123
<b>Полякова М.А., Гаврилова Н.А.</b> Современные представления о патогенетических механизмах развития диабетической оптической нейропатии . . . . .	129

## ЮБИЛЕЙ

Юбилей Ларисы Георгиевны Хетагуровой . . . . .	133
------------------------------------------------	-----

## CONTENTS

<b>Samoilov M.O., Rybnikova E.A., Churilova A.V.</b> Signal molecular and hormonal mechanisms of formation of the hypoxic preconditioning protective effects	3
<b>Semenov D.G., Belyakov A.V., Gluschenko T.S., Samoilov M.O.</b> Participation of metabotropic glutamate receptors of brain in mechanisms of hypoxic signaling	11
<b>Belosludtsev K.N., Mironova G.D.</b> The mitochondrial lipid palmitate/ $\text{Ca}^{2+}$ -induced pore and its possible role in a degradation of nervous cells	20
<b>Mednikova Yu.S., Koghechkin S.N., Kopytova F.V., Koshtojantz O.Kh.</b> Adaptive function of the brain and problems of hypoxia	33
<b>Malyshv I.Yu., Kruglov S.V., Lyamina S.V.</b> Hypoxia, inflammation and phenotypic flexibility of macrophages: the central role of HIF-1 and NFkB	42

## ORIGINAL ARTICLES

<b>Kirova Yu.I.</b> Impact of hypoxia on dynamics of the post-hypoxia HIF-1 $\alpha$ level in neocortex and adaptation forming in rats with different resistance to hypoxia	51
<b>Kruglov S.V., Bahtina L.Yu., Kalish S.V., Malysheva E.V., Budanova O.P., Manukhina E.B., Larionov N.P., Malyshv I.Yu.</b> Resistance to acute hypoxia and changes in the phenotype and phenotypic plasticity of macrophages from mice of different genetic strains	56
<b>Romanova G.A., Shakova F.M., Davudova T.V.</b> The comparison of antiischemic action of antibodies to glutamate and neuropeptide semax in the focal ischemic damage of prefrontal cortex of rat brain	62
<b>Rodionov A.N., Lobanov A.V., Morosov C.G., Sidiyakin A.A., Anikina O.M., Gribova I.E., Rybakov A.S., Protsenko A.N., Murashev A.N., Klyushnik T.P.</b> Influence of high concentration of antibodies to NGF at early embryogenesis on formation of mice behavior in postnatal period	68
<b>Kozlovsky V.L.</b> Influence of haloperidol on changes in catalepsy development reaction during subchronic injections of dopamine agonists and antagonists	75
<b>Ignashkova T.I., Mesitov M.V., Rybakov A.S., Moskovtsev A.A., Sokolovskaya A.A., Kubatiev A.A.</b> Deposition of von Willebrand factor in human endothelial cells HUVEC in the endoplasmic reticulum stress induced by an excess of homocysteine <i>in vitro</i>	81
<b>Mesitov M.V., Ignashkova T.I., Mesherskiy M.E., Akopov A.S., Sokolovskaya A.A., Moskovtsev A.A., Kubatiev A.A.</b> Redox imbalance with low ros production is associated with er stress in Jurkat cells	87
<b>Lebedeva M.A., Bogachov V.Yu., Ternovoy K.S., Nikushkina N.E., Karganov M.Yu.</b> Cardiac pathology and autonomic dysfunction in patients with vertebral and spinal cord injury	94
<b>Sobenin I.A., Karagodin V.P., Melnichenko A.A., Orekhov A.N.</b> Cholesterol of circulating immune complexes as an atherosclerosis indicator	99
<b>Myasoedova V.A., Kirichenko T.V., Orekhova V.A., Sobenin I.A., Muhamedova N.M., Martirosyan D.M., Karagodin V.P., Orekhov A.N.</b> Study of intima-medial thickness (IMT) of the carotid arteries as an indicator of natural atherosclerosis progress in Moscow population	104
<b>Bobrova N.A., Mikitiuk M.V., Kutsenko L.A., Kaidashev I.P.</b> Fulleren $\text{C}_{60}$ influence on lipids free-radical processes at bronchial asthma	109

## REVIEWS

<b>Ivanova M.M., Borodachev E.N., Sazonova M.A.</b> Human pathologies associated with mutations of mitochondrial genome	115
<b>Zhelankin A.V., Sazonova M.A.</b> Association of the mutations in the human mitochondrial genome with chronic non-inflammatory diseases: type 2 diabetes, hypertension and different types of cardiomyopathy	123
<b>Polyakova M.A., Gavrilova N.A.</b> The up-to-date conception about the pathogenic mechanisms of the diabetic optical neuropathy forming	129

## ANNIVERSARY

Khetagurova L.G.	
------------------	--

М.О. Самойлов, Е.А. Рыбникова, А.В. Чурилова

## **Сигнальные молекулярные и гормональные механизмы формирования протективных эффектов гипоксического прекондиционирования**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

*В обзоре представлены результаты многолетних исследований авторов и данные литературы, касающиеся одного из недостаточно изученных вопросов актуальной проблемы индуцированной толерантности мозга к повреждающим воздействиям — «предупредительной» сигнальной функции гипоксического прекондиционирования, молекулярных и гормональных механизмов, лежащих в основе формирования его протективных эффектов. Гипоксическое прекондиционирование умеренной гипобарической гипоксией в определенном режиме мобилизует эволюционно приобретенные генетически детерминированные защитные механизмы нейронов мозга и организма в целом путем активации многочисленных внутриклеточных компонентов сигнальной трансдукции, а также гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы. Каскадные механизмы внутриклеточной сигнализации, включающие рецепторный аппарат, дыхательную цепь митохондрий, ключевые внутриклеточные регуляторные системы, ранние гены, семейства индуцибельных и активационных транскрипционных факторов, последовательно вовлекаются в развитие процессов инициации, индукции и экспрессии гипоксической толерантности. Существенное значение для эффективной активации протективных сигнальных механизмов имеет выбор оптимального режима гипоксического прекондиционирования.*

**Ключевые слова:** гипоксическое прекондиционирование, нейрональные механизмы толерантности к гипоксии, сигнальная трансдукция, транскрипционные факторы, гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальная система

M.O. Samoilov, E.A. Rybnikova, A.V. Churilova

## **Signal molecular and hormonal mechanisms of formation of the hypoxic preconditioning protective effects**

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

*In the review, results of the long-standing authors' studies and literature data concerning one of the underresearched aspects of actual problem of induced brain tolerance to injurious factors — «preventive» signal function of the hypoxic preconditioning, as well as molecular and hormonal mechanisms underlying its protective effects are presented. Hypoxic preconditioning by using of mild hypobaric hypoxia in special mode mobilizes evolutionary acquired genome determined defense mechanisms of brain neurons and whole organism. This process involves an activation of multiple intracellular components, as well as hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Cascade mechanisms of intracellular signaling including receptors, mitochondrial respiratory chain, key intracellular regulatory systems, early genes, superfamilies of the inducible and activation transcription factors are sequentially engaged in the processes of initiation, induction and expression of hypoxic tolerance. The determination of optimal modes of hypoxic preconditioning appears to be of significant importance to assure the effective activation of protective signal mechanisms.*

**Key words:** hypoxic preconditioning, neuronal mechanisms of tolerance to hypoxia, signal transduction, transcription factors, hypothalamic-pituitary-adrenal axis

Одной из центральных проблем биологии и медицины является выяснение физиологических механизмов влияния внешней среды на организм, особенно при действии неблагоприятных повреждающих факторов. Решение этой проблемы имеет важное теоретическое и практическое значение для раскрытия механизмов при-

способительных реакций и изыскания эффективных способов повышения резистентности организма.

Существенный вклад в разработку проблемы физиологических механизмов взаимодействия нервной системы и организма в целом со средой внесли отечественные ученые И.М. Сеченов и И.П. Павлов. В работе «Физиология нервных центров» 1891 г. И.М. Сеченов писал: «...нервная система не может работать иначе как за счет внешних сил и деятельности ее должны быть направлены к тому, чтобы поддерживать индивидуальную жизнь, т.е. сохранять на-

**Для корреспонденции:** Самойлов Михаил Олегович, д-р мед. наук, проф., зам. дир. ФГБУН ИФ им. И.П. Павлова РАН. E-mail: samoilov@pavlov.infran.ru

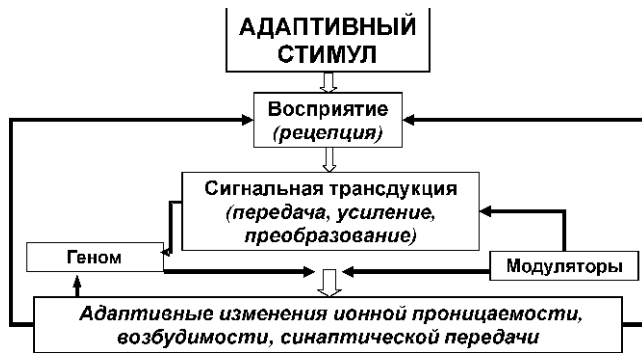


Рис. 1. Универсальный принцип формирования адаптивных реакций мозга на клеточном уровне [6]

перекор разрушающим влияниям анатомическую и физиологическую цельность тела». В изданном в США сборнике «Proceedings and Papers» (1930 г.) И.П. Павлов отмечал: «Деятельность нервной системы направляется, с одной стороны, на объединение, интеграцию работы всех частей организма, с другой — на связь организма с окружающей средой, на уравнивание системы организма с внешними условиями». «Уравнивание» И.П. Павлов понимал как постоянно идущий процесс приспособления организма к меняющимся условиям существования. Центральное место в формировании различного вида приспособительных реакций организма к факторам среды занимает процесс восприятия и трансдукции какого-либо адаптивного или, по И.П. Павлову, «предупредительного» сигнала (рис. 1).

По представлениям ученика И.П. Павлова П.К. Анохина, принцип «сигнализации», или «предупредительной деятельности» лежит в основе феномена опережающего отражения действительности — универсального явления жизни, который позволяет «предвосхитить ход будущих событий в целях наилучшего приспособления к окружающей среде» [1]. Согласно современным представлениям, процесс приспособления к возможному повреждающему воздействию в нервной системе может проявляться следующим образом: адаптивный стимул («предупредительный» сигнал — в частности, умеренные экстремальные или стрессорные воздействия) индуцирует пластические перестройки элементов нервной системы (нейронов, синапсов, глии). В основе этих перестроек лежит процессинг опережающего отражения действительности, подготавливающего клетки мозга к возможному повреждающему воздействию — индукция эволюционно-приобретенных, генетически детерминированных защитных механизмов. В результате происходит репрограммирование механизмов гибели/выживания клеток мозга, обуславливающих нейрорепрограммирование при действии повреждающих факторов.

Благодаря достижениям в области молекулярной нейробиологии расшифрованы базисные каскадные механизмы формирования приспособительных реакций нейронов мозга в ответ на адаптивный стимул [6] (рис. 2).

Одним из видов широкого класса адаптивной «предупредительной сигнализации», индуцирующей



Рис. 2. Блок-схема базисных молекулярных механизмов формирования приспособительных реакций нейронов мозга в ответ на адаптивный стимул [6]

приобретение новых навыков (ассоциативное, неассоциативное обучение, приспособление к экстремальным воздействиям), является так называемое прекодиционирующее воздействие. Термин «прекодиционирование» введен в экспериментальную практику в конце прошлого столетия. В 90-е годы прошлого столетия был обнаружен и частично расшифрован феномен ишемической/гипоксической толерантности мозга (повышения резистентности нейронов), вызываемой умеренными прекодиционирующими гипоксическими/ишемическими воздействиями [6, 8, 21, 24, 25, 28, 30].

Нейропротективные эффекты гипоксического прекодиционирования были выявлены в наших комплексных исследованиях, выполненных с использованием различных экспериментальных моделей (предъявление асфиксии *in vivo* кошкам, аноксии — переживающим срезам коры мозга *in vitro*, гипобарической гипоксии — крысам) [обзоры: 6, 8, 38, 13]. В частности, обнаружено, что прекодиционирование кратковременной асфиксией/аноксией протектирует индуцируемые повреждающей долговременной асфиксией/аноксией нарушения генерации фокальных потенциалов, активности кальциевой, фосфоинозитидной регуляторных систем (подавление гиперактивности). Прекодиционирование умеренной гипобарической гипоксией предотвращает структурные (гибель нейронов гиппокампа, новой коры) и функциональные повреждения на поведенческом уровне (нарушения обучения, памяти и др.), вызываемые тяжелой гипобарической гипоксией. Наряду с этим оказалось, что прекодиционирование гипобарической гипоксией существенно корректирует постстрессовые гормональные нарушения, а также психогенные расстройства в виде тревожно-депрессивных состояний [37]. С использованием молекулярно-биологических методов установлено, что гипоксическое прекодиционирование в определенном режиме модифицирует экспрессию факторов регуляции процессов выживания/гибели клеток, таких, как ранние гены *zif268*, *c-fos* и их продукты [3, 9, 34, 35], пептидные антиоксиданты [10, 14, 50, 51], факторы-регуляторы апоптоза (семейства генов *bcl-2* Bcl-2, Bcl-xL, Bax [12, 36], митоген-активируемых протеинкиназ [43]).

Нами установлено, что трехкратно прекодиционирование умеренной гипоксией крыс (давление в барокамере — 360 мм рт. ст., по 2 ч через сутки) снижает долю гибнущих в условиях тяжелой гипоксии животных с 50 до 15%, т.е. гипоксическое прекодиционирование способствует активации базисных адаптивных процессов, в частности, связанных с функцией гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГГАС). Последняя, как известно, обеспечивает мобилизацию защитных механизмов ор-

ганизма для формирования адаптивных реакций при действии стрессорных факторов [44]. Действительно, в наших исследованиях [4, 38] трехкратное прекодиционирование повышало по сравнению с контролем базальный уровень кортикостерона (основного глюкокортикоидного гормона у грызунов) и усиливало стрессореактивность ГГАС на иммобилизационный стресс с нормальным запуском механизмов регуляции по принципу отрицательной обратной связи (рис. 3, А, Б). Следует отметить, что однократное прекодиционирование оказывало незначительное влияние на активность и стрессореактивность ГГАС (рис. 3). При этом у данной группы животных показатель смертности в ответ на тяжелую гипоксию практически не отличался от непрекодиционированных крыс. Следовательно, одним из важнейших сигнальных механизмов, индуцируемых эффективным (трехкратным) прекодиционированием является активация ГГАС.

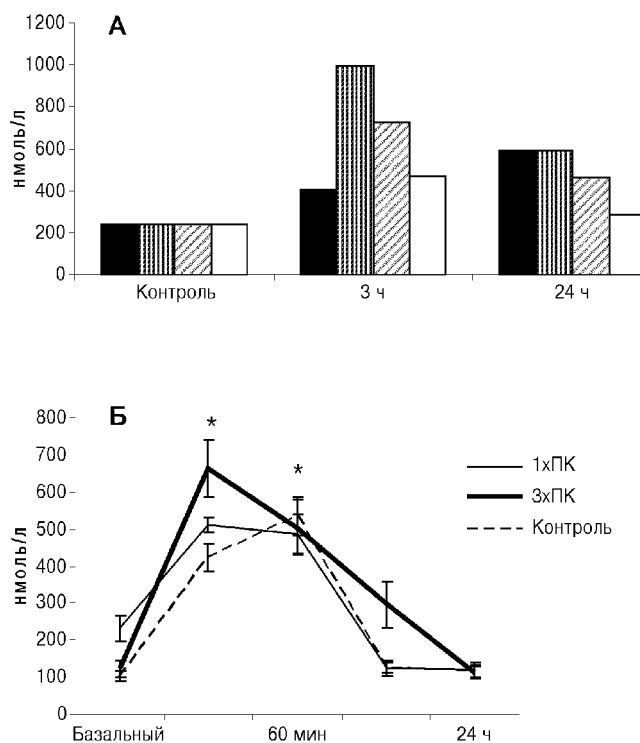


Рис. 3. Динамика функциональной активности (А) и стрессореактивности (Б) ГГАС (по уровню содержания в плазме крови кортикостерона) при предъявлении различных режимов гипобарического прекодиционирования.

А — черные столбики — тяжелая гипоксия; вертикальная штриховка — трехкратно прекодиционированная тяжелая гипоксия; косая штриховка — трехкратное прекодиционирование; белые столбики — однократное прекодиционирование;

Б — 1хПК — однократное прекодиционирование; 3хПК — трехкратное прекодиционирование.

Стрессореактивность определялась через 24 ч после последнего сеанса прекодиционирования.

К центральным вопросам рассматриваемой проблемы относится расшифровка молекулярных механизмов нейрональной сигнальной трансдукции, обеспечивающих формирование протективных эффектов гипоксического прекодиционирования. На рис. 2 представлена схема базисных внутриклеточных молекулярных каскадных механизмов сигнальной трансдукции, лежащих в основе адаптивных реакций нейронов мозга. Анализ результатов проводимых в последние два десятилетия исследований молекулярных нейрональных событий, вызываемых гипоксическим/ишемическим прекодиционированием, подтверждает их идентичность представленным на схеме. Согласно современным представлениям, процесс формирования протективных эффектов гипоксического/ишемического прекодиционирования включает две стадии (фазы): раннюю (индукция толерантности) и позднюю (экспрессию толерантности) [11, 22, 46, 48, 49]. В фазу индукции толерантности в первые часы включаются быстро индуцируемые механизмы активации протеинкиназ, протеаз, посттрансляционной модификации белков ионных каналов, рецепторов, редокс-чувствительных протеинов, возможно, временной экспрессии ранних генов. В фазу экспрессии толерантности (24 ч и более) развиваются острые геном-зависимые механизмы, обеспечивающие процессы долговременной пластичности и выживания нейронов.

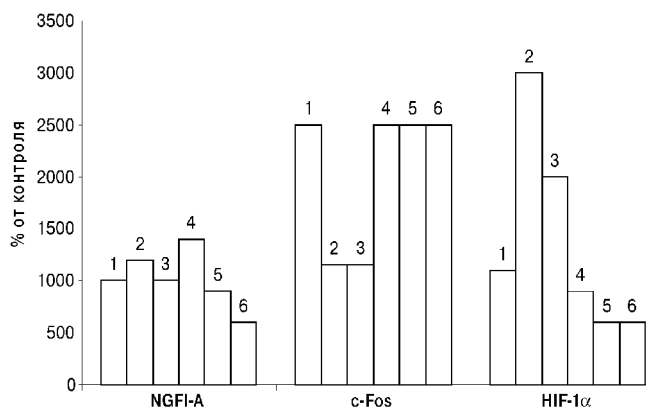
Учитывая данные Л.Д. Лукьяновой с соавторами [2, 26] и наших исследований [5, 6] целесообразно выделять начальную стадию (фазу) инициации механизмов гипоксической толерантности или срочной адаптации, которая проявляется в первые минуты после предъявления умеренного гипоксического воздействия. Эта стадия, очевидно, связана с запуском нескольких сигнальных молекулярных процессов. В частности, к ним относится ремоделирование регуляторной функции дыхательной цепи митохондрий, направленное на активацию митохондриального ферментного комплекса II, а также быстрая временная активация гипоксия-индуцибельного фактора (HIF-1 $\alpha$ ) [2, 26]. К сигнальным механизмам, индуцирующим развитие последующих стадий гипоксической толерантности мозга, следует отнести срочные изменения внутриклеточного редокс-состояния нейронов в сторону увеличения восстановительных эквивалентов и, вероятно, связанное с этим уменьшение содержания кальция, опосредованное внутриклеточными гидрофобными компонентами [5, 6].

Фаза индукции гипоксической толерантности в значительной мере обусловлена модификацией процессов внутриклеточной сигнальной трансдукции, связанных с умеренной активацией глутаматергической, кальциевой, фосфоинозитидной, цАМФ регу-

ляторных систем [6, 8, 45], сукцинат-опосредуемых сигнальных путей [26], а также, очевидно, изменениями активности про- и антиоксидативных систем [19, 31, 32]. Результатом этих событий является протеинкиназо-, протеазо-зависимая быстрая модификация белков ионных каналов, рецепторов, редокс-чувствительных протеинов, так и индукция фазы экспрессии гипоксической толерантности [11, 13]. Какие сигнальные механизмы лежат в основе трансформации фазы индукции в фазу экспрессии толерантности, индуцируемой гипоксическим прекодиционированием?

Как уже отмечалось, отсроченная стадия формирования протективных эффектов гипоксического прекодиционирования обусловлена экспрессией про-адаптивных генов и их продуктов-белков, обеспечивающих внутриклеточные пластические перестройки, направленные на сохранение жизнедеятельности (структурной целостности, функциональной активности) нейронов мозга. Основная роль в процессе экспрессии таких про-адаптивных генов принадлежит сигнальным молекулам, так называемым третичным мессенджерам [29] — транскрипционным факторам, которые после перемещения из цитозоля в ядро регулируют активность промоторов, энхансеров генов-мишеней. Транскрипционные факторы активируются компонентами кальциевой, фосфоинозитидной, цАМФ и прооксидативной внутриклеточными регуляторными системами, что происходит, как указывалось выше, при развитии стадии индукции гипоксической толерантности.

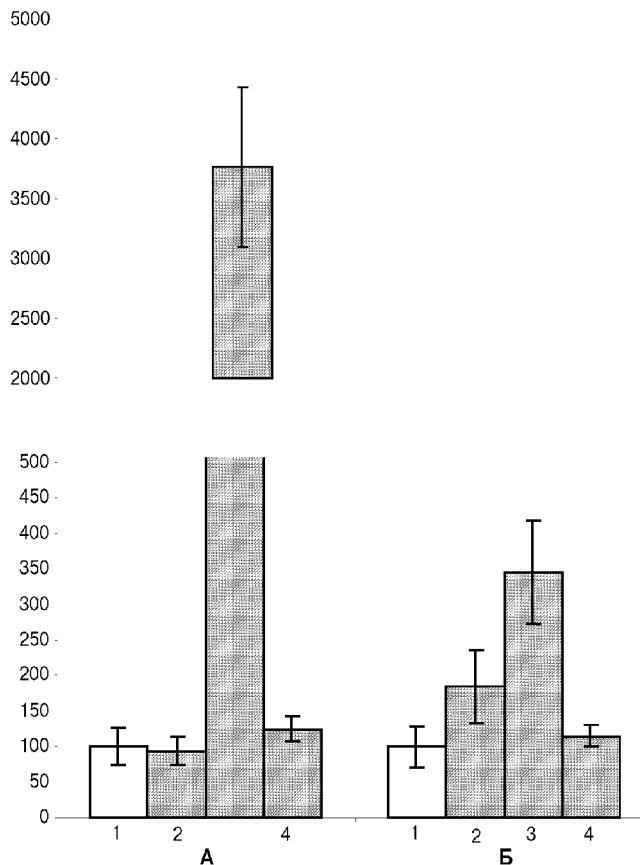
К ключевым компонентам активации генов позднего действия, продукты которых участвуют в механизмах нейрональной пластичности и выживаемости клеток относятся индуцибельные (c-Fos, NGFI-A, NIF-1) и активационные (pCREB, NF- $\kappa$ B) транскрипционные факторы. Индуцибельные транскрипционные факторы — продукты ранних генов, экспрессия которых обусловлена опосредованной внутриклеточными сигнальными каскадами ремодулирующей энзимов хроматина и модификацией гистонов, а также взаимодействием с активационными транскрипционными факторами [29, 47]. Активация NIF-1 $\alpha$  происходит за счет гипоксия-зависимой инактивации пролил-гидроксилазных реакций [20] и связана также с действием NF- $\kappa$ B, NGFI-A, MAP/ERK. Активационные транскрипционные факторы (CREB, NF- $\kappa$ B) активируются путем фосфорилирования, а также факторами клеточного стресса (цитокинами, АФК, Ca<sup>2+</sup>) [23, 27, 32]. Следует отметить, что до сих пор имеются лишь разрозненные несистематизированные данные о характере вовлечения различных транскрипционных факторов в механизмы формирования фазы экспрессии гипоксической толерантности мозга. Нами проведено комплексное исследование



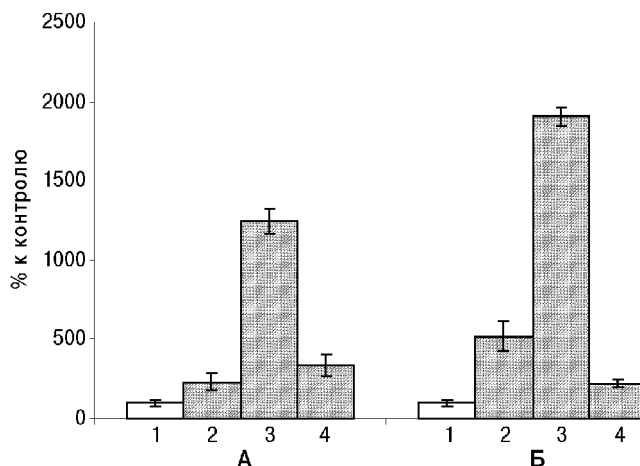
**Рис. 4.** Изменения уровней нейрональной экспрессии индуцибельных транскрипционных факторов NGFI-A, c-Fos, HIF-1α (% к контролю, по вертикали) в гиппокампе и неокортексе через 24 ч после трехкратного гипоксического прекоондиционирования. Контроль принят за 100%. Все изменения относительно контроля достоверны ( $p < 0,05$ ). Области гиппокампа: 1 – CA1; 2 – CA3; 3 – CA4; 4 – зубчатая извилина; 5 – неокортекс II слой; 6 – неокортекс V слой

характера экспрессии указанных ключевых индуцибельных и активационных транскрипционных факторов в нейронах гиппокампа и новой коры в ответ на прекоондиционирующие воздействия умеренной гипобарической гипоксией. С этой целью использован количественный иммуноцитохимический метод с компьютерной системы автоматического анализа изображения, который позволяет не только выявлять иммунопозитивные к определенным транскрипционным факторам клетки, но и оценивать степень их экспрессии.

Обнаружено, что трехкратное прекоондиционирование индуцирует устойчивую (до 24 ч после последнего сеанса) нейрональную оверэкспрессию как индуцибельных (c-Fos, NGFI-A, HIF-1α), так и активационных (pCREB, NF-κB) транскрипционных факторов во фронто-париетальном неокортексе и в различных областях гиппокампа (CA1, CA2, CA4, DG) [7, 15, 39, 40]. Выявлены некоторые особенности экспрессии различных семейств транскрипционных факторов, характерные для неокортекса и различных областей гиппокампа. На рис. 4 демонстрируются эти особенности экспрессии NGFI-A, c-Fos, HIF-1α. Обращает на себя внимание тот факт, что, несмотря на различные уровни экспрессии транскрипционных факторов, во всех исследуемых образованиях мозга происходит их «перекрестная» кооперативная активация. Полученные в последнее время результаты свидетельствуют о том, что индукция экспрессии транскрипционных факторов зависит от режима прекоондиционирующих воздействий. Так, в частности, выраженная нейрональная оверэкспрессия pCREB и NF-κB65 в неокортексе выявляется после трех-, но не одно- и шестикратных сеансов прекоондиционирования (рис. 5, А,Б). Согласно нашим данным, в от-



**Рис. 5.** Уровни нейрональной экспрессии активационных транскрипционных факторов pCREB (А) и NF-κB(65) (Б) (% по вертикали) в неокортексе через 24 ч после одно-, трех-, шестикратных прекоондиционирующих воздействий. 1 – контроль; 2, 3, 4 – 1-, 3-, 6-кратные воздействия соответственно



**Рис. 6.** Уровни нейрональной экспрессии глюкокортикоидных (А) и минералокортикоидных (Б) рецепторов (% по вертикали) в неокортексе через 24 ч после одно-, трех- и шестикратных прекоондиционирующих воздействий. Обозначения те же что на рис. 5

личие от трехкратного, одно- и шестикратное прекондиционирующие воздействия не предотвращают развития структурно-функциональных нарушений, вызываемых тяжелой гипоксией. Как известно, мишенями транскрипционных факторов NGF1-A, c-Fos, HIF-1 $\alpha$ , pCREB и NF- $\kappa$ B являются гены, продуцирующие проадаптивные белки, в частности, нейротрофины, пептидные антиоксиданты, антиапоптотические белки семейства bcl-2, семейства стресс-белков HSP, эритропоэтин и другие, вовлекаемые в процессы нейропластичности и выживания клеток при повреждающих воздействиях. Очевидно, именно индуцируемая трехкратным гипоксическим прекондиционированием кооперативная активация в гиппокампе и неокортексе указанных транскрипционных факторов («предупредительная сигнализация» на уровне генома), способствующая наиболее эффективной экспрессии проадаптивных белков, имеет важное значение для предупреждения структурно-функциональных нарушений, вызываемых повреждающими воздействиями.

Несомненный интерес представляют результаты наших исследований, касающиеся влияния гипоксического прекондиционирования на характер экспрессии транскрипционных факторов — гормональных (кортикостероидных) рецепторов. Представления о функциях минерало- и глюкокортикоидных рецепторов в различных образованиях мозга в последнее время существенно расширились. Наряду с тем, что этим рецепторам принадлежит важная роль в регуляции активности ГГАС и адаптивных процессах, установлено их вовлечение в процессы гибели/выживания нейронов, обучения и памяти [16, 17, 18, 33, 41, 42]. Согласно результатам наших исследований, трехкратное прекондиционирующее воздействие оказывает существенное влияние на экспрессию кортикостероидных рецепторов в дозальном и вентральном гиппокампе и неокортексе крыс [41]. Одно- и шестикратное прекондиционирующие воздействия проявляют такой эффект в значительно меньшей степени. На рис. 6, А и Б в качестве примера демонстрируется сравнительный эффект влияния различных режимов прекондиционирования на экспрессию глюко- и минералокортикоидных рецепторов — транскрипционных факторов, в нейронах неокортекса.

Подводя итог вышеизложенному, следует заключить, что гипоксическое прекондиционирование в определенном режиме являясь разновидностью «предупредительной» сигнализации, мобилизует эволюционно приобретенные генетически детерминированные защитные механизмы нейронов мозга и организма в целом, повышая их резистентность путем активации многочисленных внутриклеточных компонентов сигнальной трансдукции, а также гипоталамо-гипо-

физарно-адренкортикальной системы. Каскадные механизмы внутриклеточной сигнализации, включающие рецепторный аппарат, дыхательную цепь митохондрий, ключевые внутриклеточные регуляторные системы, ранние гены, семейства индуцибельных и активационных транскрипционных факторов, последовательно вовлекаются в развитие процессов инициации, индукции и экспрессии гипоксической толерантности. Важное значение для эффективной индукции протективных сигнальных молекулярных и гормональных механизмов имеет выбор оптимального режима гипоксического прекондиционирования.

*Работа поддержана грантами РФФИ №11-04-00677 и 10-04-00371.*

### Список литературы

1. **Анохин П.К.** Биология и нейрофизиология условного рефлекса. — М.: Медицина, 1968.
2. **Лукьянова Л.Д.** Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2011. — Т. 1. — С. 2—18.
3. **Рыбникова Е.А., Хожай Л.И., Тюлькова Е.И.** и др. Влияние гипобарической гипоксии на экспрессию белков ранних генов и структурные изменения нейронов мозга: корректирующий эффект прекондиционирования // Морфология. — 2004. — Т. 125, 2. — С. 10—15.
4. **Рыбникова Е.А., Миронова В.И., Пивина С.Г.** и др. Гормональные механизмы нейропротективных эффектов гипоксического прекондиционирования у крыс — Доклады РАН. — 2008. — Т. 421, 5. — С. 239—240.
5. **Самойлов М.О.** Реакции нейронов мозга на гипоксию. — Л.: Наука, 1985. — 190 с.
6. **Самойлов М.О.** Мозг и адаптация. Молекулярно-клеточные механизмы. — СПб.: ИНФ РАН, 1999. — 272 с.
7. **Самойлов М.О.** Механизмы формирования толерантности мозга к повреждающим воздействиям, индуцируемые гипоксическим прекондиционированием // Гипоксическое, ишемическое прекондиционирование мозга: Материалы Российско-Польского рабочего симпозиума. — СПб., 2008. — С. 51—55.
8. **Самойлов М.О., Лазаревич Е.В., Семенов Д.Г.** и др. Адаптивные эффекты прекондиционирования нейронов мозга // Физиол. журн. им. Сеченова. — 2001. — Т. 87, 6. — С. 714—729.
9. **Самойлов М.О., Рыбникова Е.А., Тюлькова Е.И.** и др. Влияние гипобарической гипоксии на поведенческие реакции и экспрессию ранних генов в мозге крыс: корректирующий эффект прекондиционирующего воздействия // Доклады АН. — 2001. — Т. 381, 1. — С. 513—515.
10. **Самойлов М.О., Рыбникова Е.А., Тюлькова Е.И.** и др. Митохондриальные антиоксиданты тиоредоксин-2 и Mn-супероксиддисмутаза вовлекаются в механизмы гипоксической толерантности мозга // Доклады АН. — 2002. — Т. 387, 3. — С. 498—500.
11. **Самойлов М.О., Семенов Д.Г., Тюлькова Е.И.** и др. Молекулярные механизмы кратко- и долговременных эффектов гипоксического прекондиционирования // Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологиче-



ские и медицинские аспекты: Коллективная монография / Отв. ред. Л.Д. Лукьянова, И.Б. Ушаков. — М.: Искожи, 2003. — С. 96—111.

12. *Самойлов М.О., Ситник Н.А., Рыбникова Е.А.* и др. Особенности экспрессии про- и антиапоптотических белков Вах и Bcl-2 в нейронах мозга крыс в ответ на тяжелую гипобарическую гипоксию: корректирующий эффект гипоксического preconditionирования // Доклады АН. — 2005. — Т. 402, 4. — С. 176—178.

13. *Самойлов М.О., Рыбникова Е.А.* Молекулярно-клеточные и гормональные механизмы индуцированной толерантности мозга к экстремальным факторам среды // Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. — 2012.

14. *Строев С.А., Самойлов М.О.* Эндогенные антиоксиданты. — СПб.: ИНФ РАН, 2006. — 145 с.

15. *Чурилова А.В., Рыбникова Е.А., Глущенко Т.С.* и др. Влияние умеренной гипобарической гипоксии в режиме preconditionирования на экспрессию транскрипционных факторов pCREB и NF-κB в гиппокампе мозга крыс до и после тяжелой гипоксии // Морфология. — 2009. — Т. 136, 6. — С. 38—42.

16. *Almeida O., Conde G., Crochmore C.* et al. Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate // FASEB J. — 2000. — Vol. 14. — P. 79—790.

17. *De Kloet E.R., Vreugdenhil E., Oitzl M.S., Joels M.* Brain corticosteroid receptor balance in health and disease // Endocr. Rev. — 1998. — Vol. 19, 3. — P. 269—301.

18. *De Kloet E.R., Joels M., Holsboer F.* Stress and the brain: from adaptation to disease // Nature Rev. Neurosci. — 2005. — Vol. 6. — P. 463—475.

19. *Furuichi T., Liu W., Shi H.* et al. Generation of hydrogen peroxide during brief oxygen-glucose deprivation induces preconditioning neuronal protection in primary cultured neurons // J. Neurosci. Res. — 2005. — Vol. 79, 6. — P. 816—824.

20. *Kallio P.S., Wilson W.J., O'Brein S.* et al. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1α by the ubiquitin-proteasome pathway // J. Biol. Chem. — 1999. — Vol. 274. — P. 6519—6525.

21. *Kirino T, Tsujita Y, Tamura A.* Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 1991. — Vol. 11, 2. — P. 299—307.

22. *Kirino T.* Ischemic tolerance // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 2002. — Vol. 22. — P. 1283—1296.

23. *Kitagawa K.* CREB and cAMP response element-mediated gene expression in the ischemic brain // FEBS J. — 2007. — Vol. 274. — P. 3210—3217.

24. *Kitagawa K., Matsumoto M., Tagaya M.* et al. «Ischemic tolerance» phenomenon found in the brain // Brain Res. — 1990. — Vol. 528. — P. 21—24.

25. *Liu Y., Kato H., Nakata N., Kogure K.* Temporal profile of heat shock protein 70 synthesis in ischemic tolerance induced by preconditioning ischemia in rat hippocampus // Neuroscience. — 1993. — Vol. 56, 4. — P. 921—927.

26. *Lukyanova L.D., Germanova E.L., Kirova Yu.I.* The Signal Function of Succinate and Free Radicals in Mechanisms of Preconditioning and Long-term Adaptation to Hypoxia // Adaptation Biology and Medicine. Vol. 6: Cell Adaptations and Challenges / Editors: P. Wang, C.-H. Kuo, N. Takeda, P.K. Singal. — Narosa Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi, India. 2011. — P. 251—277.

27. *Mattson M.P., Culmsee C., Yu Z., Camandola S.* Roles of nuclear factor kappaB in neuronal survival and plasticity // J. Neurochem. — 2000. — Vol. 74. — P. 443—456.

28. *Miyashita K., Abe H., Nakajima T.* et al. Induction of ischaemic tolerance in gerbil hippocampus by pretreatment

with focal ischaemia // Neuroreport. — 1994. — Vol. 6, 1. — P. 46—48.

29. *Morgan J.I., Curran T.* Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun // Annu. Rev. Neurosci. — 1991. — Vol. 14. — P. 421—451.

30. *Obrenovitch T.P.* Molecular physiology of preconditioning-induced brain tolerance to ischemia // Physiol. Rev. — 2008. — Vol. 88. — P. 211—247.

31. *Perez-Pinzon M.A., Dave K.R., Raval A.P.* Role of reactive oxygen species and protein kinase C in ischemic tolerance in the brain // Antioxid. Redox. Signal. — 2005. — Vol. 7, 9—10. — P. 1150—1157.

32. *Ravati A., Ahlemeyer B., Becker A., Kriegstein J.* Preconditioning-induced neuroprotection is mediated by reactive oxygen species // Brain Res. — 2000. — Vol. 866. — P. 23—32.

33. *Rogalska J.* Mineralocorticoid and Glucocorticoid Receptors in Hippocampus: Their Impact on Neurons Survival and Behavioral Impairment After Neonatal Brain Injury // Vitamins and Hormones. — 2010. — Vol. 82. — P. 392—419.

34. *Rybnikova E., Tulkova E., Pelto-Huikko M., Samoilov M.* Mild preconditioning hypoxia modifies NGFI-A mRNA expression in the rat brain induced by severe hypoxia // Neuroscience Letters. — 2002. — Vol. 329, 1. — P. 49—52.

35. *Rybnikova E., Vataeva L., Tyulkova E.* et al. Preconditioning prevents impairment of passive avoidance learning and suppression of brain NGFI-A expression induced by severe hypoxia // Beh. Brain. Res. — 2005. — Vol. 160, 1. — P. 107—114.

36. *Rybnikova E., Sitnik N., Gluschenko T.* et al. The preconditioning modified neuronal expression of apoptosis-related proteins of Bcl-2 superfamily following severe hypobaric hypoxia in rats // Brain Res. — 2006. — Vol. 1089, 1. — P. 195—202.

37. *Rybnikova E., Mironova V., Pivina S.* et al. Antidepressant-like effects of mild hypoxia preconditioning in the learned helplessness model in rats // Neurosci. Lett. — 2007. — Vol. 417, 3. — P. 234—239.

38. *Rybnikova E., Mironova V., Pivina S.* et al. Involvement of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the antidepressant-like effects of mild hypoxic preconditioning in rats // Psychoneuroendocrinology. — 2007. — Vol. 32, 7. — P. 812—823.

39. *Rybnikova E., Gluschenko T., Tulkova E.* et al. Preconditioning induces prolonged expression of transcription factors pCREB and NF-κB in the neocortex of rats before and following severe hypobaric hypoxia // Journal of Neurochemistry. — 2008. — Vol. 106. — P. 1450—1458.

40. *Rybnikova E., Glushchenko T., Tyulkova E.* et al. Mild hypobaric hypoxia preconditioning up-regulates expression of transcription factors c-Fos and NGFI-A in rat neocortex and hippocampus // Neurosci. Res. — 2009. — Vol. 65. — P. 360—366.

41. *Rybnikova E., Glushchenko T., Churilova A.* et al. Expression of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in hippocampus of rats exposed to various modes of hypobaric hypoxia: Putative role in hypoxic preconditioning // Brain Res. — 2011. — Vol. 1381. — P. 66—77.

42. *Rybnikova E., Vataeva L., Tyulkova E.* et al. Preconditioning prevents impairment of passive avoidance learning and suppression of brain NGFI-A expression induced by severe hypoxia // Beh. Brain. Res. — 2005. — Vol. 160, 1. — P. 107—114.

43. *Samoilov M.O., Rybnikova E.A., Sitnik N.A.* et al. Preconditioning modifies the activities of mitogen-activated protein kinases and c-Jun transcription factor in rat hippo-

---

campus after severe hypobaric hypoxia // *Neurochemical Journal*. — 2007. — Vol. 1, 3. — P. 219–226.

44. *Selye H.* Stress and the general adaptation syndrome // *Br. Med. J.* — 1950. — Vol. 4667. — P. 1383–1392.

45. *Semenov D.G., Samoilov M.O., Zielonka P., Lazarewicz J.W.* Calcium transients in the model of rapidly induced anoxic tolerance in rat cortical slices: Involvement of NMDA receptors // *Neurosignals*. — 2002. — Vol. 11, 6. — P. 329–335.

46. *Shpargel K.B., Jalabi W., Jin Y., Dadabayev A., Penn M.S., Trapp B.D.* Preconditioning paradigms and pathways in the brain // *Cleve Clin. J. Med.* — 2008. — Vol. 75. — P. S77–82.

47. *Sng J.C., Taniura H., Yoneda Y.* A tale of early response genes // *Bio Pharm. Bull.* — 2004. — Vol. 27. — P. 606–612.

48. *Steiger H.J., Hangii D.* Ischaemic preconditioning of the brain, mechanisms and applications // *Acta Neurochir. (Wien)*. — 2007. — Vol. 149. — P. 1–10.

49. *Stenzel-Poore M.P., Stevens S.L., King J.S., Simon R.P.* Preconditioning reprograms the response to ischemic injury and primes the emergence of unique endogenous neuroprotective phenotypes: a speculative synthesis // *Stroke*. — 2007. — Vol. 38. — P. 680–685.

50. *Stroev S.A., Gluschenko T.S., Tjulkova E.I.* et al. Preconditioning enhances the expression of mitochondrial antioxidant thioredoxin-2 in the forebrain of rats exposed to severe hypobaric hypoxia // *J. Neurosci. Res.* — 2004. — Vol. 78. — P. 563–569.

51. *Stroev S.A., Tjulkova E.I., Gluschenko T.S.* et al. The augmentation of brain thioredoxin-1 expression after severe hypobaric hypoxia by the preconditioning in rats // *Neurosci. Lett.* — 2004. — Vol. 370, 2–3. — P. 224–229.

Поступила 13.04.12

#### Сведения об авторах:

*Рыбникова Елена Александровна*, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. нейроэндокринологии ФГБУН ИФ им. И.П. Павлова РАН

*Чурилова Анна Викторовна*, младш. науч. сотр. лаб. регуляции функции нейронов мозга ФГБУН ИФ им. И.П. Павлова РАН

Д.Г. Семенов, А.В. Беляков, Т.С. Глущенко, М.О. Самойлов

## Участие метаботропных глутаматных рецепторов мозга в механизмах гипоксической сигнализации

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН,  
199034 Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

Метаботропные глутаматные рецепторы I группы (*ImGluRs*) относятся к семейству G-белок связанных рецепторов, которые активируют множество сигнальных путей важных для модуляции нейрональной возбудимости и синаптической пластичности, а также сигнальных путей гибели и выживания нейронов, которые инициирует гипоксия. Однако представления об этих функциях пока не полны и иногда противоречивы. В настоящей работе представлен обзор литературы о вовлечении *ImGluRs* в механизмы клеточного ответа на гипоксию. Приведены также собственные данные, демонстрирующие их участие в формировании как патогенных, так и адаптивных внутриклеточных перестроек, возникающих в течение суток в коре мозга крыс, подвергнутых тяжелой или умеренной гипобарической гипоксии, соответственно. Для этих двух гипоксических моделей на инкубируемых срезах коры выявлена специфика  $Ca^{2+}$  ответов на стимуляцию *ImGluRs*, а на гистологических препаратах определена экспрессия белков этих рецепторов и ключевых участников их канонического сигналинга — *IP3Rs* и *PLCβ1*.

**Ключевые слова:** кора мозга, кальций, *ImGluRs*, *IP3Rs*, *PLCβ1*, гипобарическая гипоксия, гипоксическая толерантность

D.G. Semenov, A.V. Belyakov, T.S. Gluschenko, M.O. Samoilov

## Participation of metabotropic glutamate receptors of brain in mechanisms of hypoxic signaling

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

Group I of metabotropic glutamate receptors (*ImGluRs*) are a family of G-protein-coupled receptors which activate a multitude of signaling pathways important for modulating neuronal excitability and synaptic plasticity as well as anti- and pro-survival pathways initiated by hypoxia. However these functions are still not complete and sometimes controversial. The present work is a review of data concerning involvement of *ImGluRs* in mechanisms of cell response to hypoxia. We also present original data demonstrating their participation in forming pathogenic and adaptogenic intracellular events, appearing in rat neocortex during a day after severe or moderate hypobaric hypoxia, respectively.  $Ca^{2+}$  responses to *ImGluRs* stimulation in survival cortical slices and expression of *ImGluRs*, *IP3Rs* and *PLCβ1* in immunolabelled cortical preparations were estimated for these two different hypoxic models.

**Key words:** brain cortex, calcium, *ImGluRs*, *IP3Rs*, *PLCβ1*, hypobaric hypoxia, hypoxic tolerance

Одним из эффектов временной гипоксии мозга является активация глутаматных рецепторов, изменяющая баланс внутриклеточных сигнальных путей, присутствующих в нормоксическом состоянии и участвующая в запуске реакций патологической или адаптивной модальности. В последнее десятилетие особо интенсивно исследуется именно нейропротективный эффект умеренных форм гипоксии. Феномен «индуцированной гипоксической толерантности» мозга заключается в том, что после умеренного гипоксического (ишеми-

ческого) воздействия повышается устойчивость нейронов к последующим воздействиям более тяжелых форм гипоксии или ишемии. Доказано существование раннего и позднего механизмов индуцированной гипоксической толерантности, которые экспрессируются, соответственно, в течение десятков минут или десятков часов после прекодиционирующего стимула [4, 6, 37, 40, 42].

Ключевая роль глутаматергической системы в развитии гипоксической и постгипоксической патологии мозга не вызывает сомнения и составляет основу представлений об эксайтотоксичности тяжелой гипоксии [24]. Вместе с тем участие этой системы в формировании гипоксической толерантности, вызываемой прекодиционированием, мало изучено. Глутамат,

Для корреспонденции: Семенов Дмитрий Германович, д-р биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. регуляции функций нейронов мозга, ФГБУН ИФ им. И.П. Павлова.  
E-mail: dsem50@rambler.ru

межклеточная концентрация которого повышается в результате гипоксии, выступает лигандом для нескольких типов ионотропных и метаботропных рецепторов, в разной степени представленных в разных областях мозга и в разных участках нейронов и глиальных клеток. Ионотропные рецепторы (NMDARs и AMPARs) и их каналы играют основную роль в деполяризации и избыточном проникновении в цитозоль внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Na}^{+}$  во время и после гипоксии. Несколько групп метаботропных глутаматных рецепторов (mGluRs) обычно относят к категории модуляторов активности ионотропных рецепторов, действующих через каскады внутриклеточных энзимов. В связи с этим логично предположить их особую модулирующую роль при выборе нейроном либо путей выживания и адаптогенеза, либо патогенеза и гибели. Выяснение роли mGluRs в процессах индукции и экспрессии гипоксической толерантности осложняется большим числом их подтипов, с различными сигнальными путями и локализацией в клетке; наличием обратных связей в сигнальных путях и в способах межрецепторных взаимодействий; возможностью их транспортировки между плазмолеммой и цитозолем; способностью функционировать не только на плазмолемме, но и на внутриклеточных мембранах и многим другим. Не ясно, в какой степени, и какими механизмами mGluRs, а именно mGluRs I группы (ImGluRs), прекодицированных животных обуславливают гипоксическую толерантность мозга на ранних и поздних этапах ее формирования.

В данном обзоре обсуждается ряд указанных вопросов с привлечением данных литературы и результатов собственных исследований.

### **Глутаматные рецепторы и $\text{Ca}^{2+}$ в реакции нейронов на гипоксию**

Важным фактором в механизмах гибели или выживания нейронов после гипоксии выступает накопление в цитоплазме ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Повышение концентрации этого ключевого внутриклеточного посредника происходит за счет его поступления из внеклеточной среды и/или высвобождения из внутренних депо, баланс этих потоков в значительной мере обусловлен модификациями активности как ионотропных, так и метаботропных глутаматных рецепторов. Установлено, что развертывание программы гибели или выживания нейронов мозга после гипоксического insultа определяется степенью и длительностью повышения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , конкретными каналами его проникновения в цитозоль, субклеточной локализацией его «избытка» и другими параметрами [15, 19, 49]. На различных моделях гипоксии нервной ткани, выделенной из мозга (*ex vivo*) изучают обычно ближайшие последствия временной гипоксии, аноксии или

кислородно-глюкозной депривации (OGD). Специфика объекта позволяет наблюдать клеточный ответ на гипоксию не дольше нескольких часов. Вместе с тем, именно на этих моделях были раскрыты основные срочные глутамат-зависимые и  $\text{Ca}^{2+}$ -опосредованные механизмы как патологической, так и адаптивной направленности [19, 33, 41].

Наши исследования, выполненные более десяти лет назад, с предъявлением переживающему срезу коры мозга крысы 10 мин аноксии (тяжелая форма) показали, что во время самой аноксии внутриклеточная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  существенно повышается. Реоксигенация быстро нормализует ее, но ненадолго. Развивается вторичный рост уровня внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , отражающий характерную для нейродегенеративных постгипоксических состояний «кальциевую перегрузку». Применение антагонистов глутаматных рецепторов доказало, что обе фазы нарушения обмена  $\text{Ca}^{2+}$  определяются активацией этих рецепторов, прежде всего NMDA типа [9], что подтверждает концепцию эксайтотоксичности острой гипоксии. На этом же объекте 2-минутная аноксия (умеренная форма) приводила к сдвигам уровня  $\text{Ca}^{2+}$  той же направленности, но существенно меньшей амплитуды. 10 мин аноксии на фоне такого сдвига (через час после прекодицирующей 2-минутной аноксии) не сопровождалось кальциевой перегрузкой. Таким образом, уже в течение 1 часа после прекодицирующего стимула срезы коры обретают гипоксическую толерантность, что совпадает с умеренным повышением уровня  $\text{Ca}^{2+}$ . Важно отметить, что и это повышение обеспечивалось активностью глутаматных рецепторов, так как предварительная аппликация соответствующих антагонистов предотвращала его и снимало сам нейропротективный эффект прекодицирования [9, 42].

Для оценки различных более отдаленных постгипоксических модификаций кальциевых сигналов, связанных с глутаматергической трансдукцией, применялись два режима гипобарического воздействия на крыс *in vivo*, используемого в нашей лаборатории. Умеренная и тяжелая гипобарические гипоксии (УГГ и ТГГ соответственно), представляют собой воздействия различной модальности. Если ТГГ имеет нейродегенеративные последствия, то УГГ (точнее, серия из 3 УГГ) развивает в течение последующих суток гипоксическую толерантность мозга. В отношении глутамат-опосредованных  $\text{Ca}^{2+}$  сигналов это доказывается тем, что ТГГ, предъявленная после УГГ, не вызывает характерных нарушений глутаматной рецепции [2, 43], а 10-минутная аноксия, предъявленная срезу мозга УГГ-прекодицированного животного, не приводила кальциевой перегрузки [10]. В срезах мозга, полученных в течение первых 6 ч по-

сле ТГГ, кальциевые ответы на стимуляцию глутаматных рецепторов полностью подавлены, однако, через 24 ч чувствительность рецепторов к глутамату не только восстанавливается, но и существенно повышается, а к 72 ч отмечается повторная волна их депрессии [2]. Вместе с тем, постгипоксическая активация глутаматергической  $Ca^{2+}$ -опосредованной сигнализации возникает не только после ТГГ, но и через сутки после УГГ. Однако степень этого усиления и его временной паттерн специфичны для каждого из рецепторных типов (NMDARs, AMPARs и ImGluRs) и отличны от таковых, выявленных после ТГГ. При этом нами было установлено, что наибольшее различие демонстрируют паттерны  $Ca^{2+}$ -ответов на стимуляцию ImGluRs. Данное обстоятельство вызвало особый интерес к выяснению роли этой группы рецепторов в адаптивных и патологических процессах, индуцируемых гипоксией.

### Сигнальные пути ImGluRs и их вовлечение в патогенные и адаптогенные эффекты гипоксии

ImGluRs относятся к семейству рецепторов, сопряженных с G-белками, а именно с белком  $G\alpha_q/11$ , который в ответ на присоединение глутамата к лигандчувствительной субъединице ImGluR активирует фосфолипазу  $C\beta$  (PLC $\beta$ ), гидролизующую один из мембранных дифосфоинозитидов — фосфоинозитол(4,5)дифосфат (PIP2) с образованием двух вторичных посредников: диацилглицерола (DAG) и инозитол-3-фосфата (IP3). DAG облегчает  $Ca^{2+}$ -зависимую активацию протеинкиназы-C (PKC), обеспечивает ее транслокацию от цитозоля к плазмолемме и пролонгирует ее активное состояние. Активированная PKC, в свою очередь, запускает каскад фосфорилирования многих мембранных белков, в том числе потенциалуправляемых и лигандуправляемых  $Ca^{2+}$ -каналов. В свою очередь IP3 взаимодействует с рецепторами (IP3Rs) внутриклеточных мембран и вызывает высвобождение  $Ca^{2+}$  из внутренних депо в цитозоль. В конечном итоге оба каскада, хотя с разной динамикой и разными путями, способствуют повышению уровня  $Ca^{2+}$  в цитозоле и  $Ca^{2+}$ -опосредованной активации многих регуляторных белков [27].

Принимая во внимание представления о том, что запуск адаптогенных или патогенных постгипоксических процессов зависит от умеренного или чрезмерного повышения уровня внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , соответственно, следует отметить, что и та и другая его степень могла бы обеспечиваться только лишь указанными PLC-зависимыми путями. Это возможно благодаря сложности и пластичности каждого из плеч этого сигналинга (DAG и IP3-зависимого). В частности, эффективность передачи сигнала от ImGluRs к IP3Rs с помощью посредника IP3 зависит от белко-

вой конформации цитозоля между ними, которая обеспечивается лабильным семейством белков Homer [23]. Они же, взаимодействуя с «анкерными» белками других рецепторов, могут менять эффективность модуляционной связи ImGluRs с NMDARs и AMPARs, таким образом, ослаблять или усиливать поток внеклеточного  $Ca^{2+}$  [28]. В зависимости от того, какой из подтипов ImGluRs (1 или 5) влияет на IP3Rs, и в зависимости от состояния последних, в цитозоле возникают осцилляции концентрации  $Ca^{2+}$ -различных паттернов. [18]. Предполагается, что именно это явление способствует запуску либо адаптивных, либо патогенных  $Ca^{2+}$ -зависимых регуляторных каскадов. Обнаружено, что в некоторых отделах мозга, в частности в коре, mGluR1 предпочтительно реализуют PKC, а не IP3 сигналинг [29], таких свойств для mGluR5 не отмечено.

Долгое время описанные сигнальные механизмы считали основными (каноническими). Относительно недавно было обнаружено, что фермент фосфатидинозитол-3 киназа (PI3K) способен производить дальнейшее и предельно возможное фосфорилирование PIP2 с образованием фосфо-тидилинозитол(3,4,5) трифосфата (PIP3). Этот фосфоинозитид активирует протеинкиназу-B (Akt), известный ключевой фермент множества анаболических процессов адаптивной направленности, предотвращающих апоптоз [35]. Одним из стимулов активации PI3K, как и PLC, является возбуждение ImGluRs [51]. Связь ImGluRs с сигнальным каскадом PI3K/Akt не вполне раскрыта, но интенсивно изучается. Установлено, в частности, что умеренная активация ImGluRs в течение 30 мин заметно увеличивает фосфорилирование Akt [39] и снижает апоптотическую гибель клеток от последующей «ишемии» *ex vivo* (модель OGD).

Следует отметить, что обе составляющие ImGluRs сигнализации: канонические каскады PIP2/PLC/DAG,IP3 и PLC-независимый каскад PIP2/PI3K/PIP3/Akt, взаимосвязаны. С одной стороны, известны  $Ca^{2+}$ -зависимые механизмы активации PI3K с помощью  $Ca^{2+}$ /CaMKK [50], с другой стороны, отмечается Akt-опосредованное ограничение чрезмерного высвобождения  $Ca^{2+}$  из эндоплазматического ретикула [46].

Некоторые авторы считают, что ImGluRs включены в ряд патологических ответов, в частности, в генерацию ишемического и постишемического повреждения [25, 32]. Такие представления основываются на способности осуществлять IP3-зависимое повышение концентрации внутриклеточного  $Ca^{2+}$  и PKC-зависимую активацию  $Ca^{2+}$  каналов плазмолеммы, в том числе ассоциированных с NMDARs [14, 44]. Одним из следствий выступает активация риадиноновых рецепторов эндо-плазматического ретикула и доба-

вочное высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из депо. Часть этих представлений подтверждаются в модельных экспериментах. Показано, что DHPG, агонист  $\text{mGluRs}$ , потенцирует вход  $\text{Ca}^{2+}$ , опосредованный возбуждением NMDARs в культуре корковых нейронов, подвергнутых OGD [13]. Другим губительным для клетки следствием чрезмерного усиления IP3 сигналинга выступает так называемый «стрессорный ответ эндоплазматического ретикула». В результате обеднения ретикула кальцием нарушаются механизмы трансляции и фолдинга адаптивных белков и накопление белков, активирующих апоптоз [47].

Вместе с тем, множество работ свидетельствуют о нейропротективной роли  $\text{mGluR}$ . В экспериментальных моделях *ex vivo* их активация защищала клетки мозга от повреждающего воздействия NMDA [16, 20], аноксии [48] и OGD [30]. Причем, и эти эффекты связываются с PLC-зависимым сигналингом и, очевидно, характерны для механизмов быстрой экспрессии нейрональной толерантности. Другой быстрый нейропротективный механизм, обнаруженный на культуре и срезах гиппокампа — интернализация ионотропных рецепторов, вызванная  $\text{mGluR}$ -зависимой стимуляцией белков, управляющих эндоцитозом [17, 45]. Дальнейшие исследования показали, что протекция может реализоваться на множестве более сложных и, потому, более медленных сигнальных путей. Например, активация  $\text{mGluR}$  препятствует деградации ДНК через Akt — опосредованную антиапоптотическую систему [16, 21]. Вероятно, такие не прямые и сложные ветви  $\text{mGluR}$  сигналинга могут включаться в механизмы долгосрочной стойкой экспрессии гипоксической толерантности.

Источником противоречий в оценке роли  $\text{mGluRs}$  в гипоксических и постгипоксических процессах в мозге выступает сама природа этого типа рецепторов, главное назначение которых — тонкая модуляция и координация исключительного множества внутриклеточных сигнальных путей. При этом направленность такой модуляции должна зависеть от функционального состояния клетки, ее генетического предназначения, паттерна межклеточных отношений, организменных факторов ответа на гипоксию, разумеется, от самой степени «гипоксической угрозы» и других факторов. Все это, очевидно, и определяет конечную роль  $\text{mGluRs}$  при выборе нейроном своей «постгипоксической судьбы». Для раскрытия этой роли необходимо выявить различия в функциональной активности, синтезе, транслокации и прочих характеристиках самих рецепторов и ключевых участников их сигнальных путей в мозге животных, переживших гипоксические воздействия противоположных модальностей. В практическом аспекте особую важность представляет исследование долгосрочных форм гипоксической

толерантности, вызываемой гипоксией *in vivo*. В последние годы нами уделяется особое внимание соответствующим экспериментальным моделям. Модель гипобарической гипоксии весьма удобна в исполнении и дозировке, а также соответствует экологически естественным экстремальным ситуациям, с которыми сталкиваются люди определенных профессий (краткосрочное пребывание в «высокогорье» с применением легких летательных аппаратов или в ходе горнолыжных тренировок, повреждения герметичных летательных аппаратов и пр.). Адаптивный (нейропротективный) эффект дозированной гипобарической гипоксии показан в многолетних исследованиях нашей лаборатории на экспериментальных животных. С использованием этой модели проводятся исследования различных отделов мозга крыс *in vitro* на различных сроках реоксигенации после предъявления животным *in vivo* гипобарической гипоксии обеих модальностей. Такие подходы позволяют судить, во-первых, о влиянии на клетки мозга гипоксии целого организма, в отличие от гипоксии объекта *ex vivo*, во-вторых, раскрывают кинетику формирования постгипоксической патологии мозга или, напротив, развития его долгосрочной гипоксической толерантности.

### Модели гипобарической гипоксии

Тяжелая (патогенная) гипобарическая гипоксия (ТГГ) создается животным в гипобарической камере проточного типа однократно в течение 3 ч путем разрежения воздуха до 180 мм Hg, что соответствует подъему на 10000—11000 м над уровнем моря. Это воздействие обычно выдерживают лишь 50% животных. Выжившие используются для изучения патологических последствий в течение 1—7 суток. ТГГ применяется и как тестирующее воздействие на прекондиционированных животных. Умеренная (адаптогенная) гипобарическая гипоксия (УГГ) создается раз в сутки в течение 2 ч путем разрежения воздуха до 360 мм Hg («подъем» на 5000 м над уровнем моря). Выживаемость крыс после такого воздействия в его эффективной дозировке (3-кратное) составляет не менее 85%. УГГ применяется для исследования динамики формирования стойких адаптивных процессов и для изучения механизмов нейропротекции, как прекондиционирующая мера за сутки до предъявления ТГГ или тяжелых стрессорных воздействий.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что у крыс, выживших после ТГГ, развиваются структурные повреждения нейронов неокортекса и гиппокампа [3, 36, 37], нарушается обучение и память [1, 36], изменяется экспрессия ранних генов и транскрипционных факторов [5, 36], активируются проапоптотические факторы [8, 37]. Предшествующая УГГ в значительной степени предотвращает структур-

но-функциональные повреждения [1, 3, 5, 10, 36, 37, 43] и индуцирует повышение экспрессии транскрипционных факторов *c-Fos*, NGFI-A,  $\rho$ CREB, NF $\kappa$ рaB, активирующих проадаптивные гены и их продукты [3, 36, 38], пептидных антиоксидантов [12], а также антиапоптотических факторов [7, 8, 37].

### Оценка кальциевых ответов на стимуляцию глутаматных рецепторов в переживающих срезах коры мозга после УГГ и ТГГ

Задачей данного фрагмента наших исследований было сравнение динамических характеристик кальциевых ответов на стимуляцию различных типов глутаматных рецепторов их агонистами в инкубируемых срезах коры мозга крыс, переживших воздействие ТГГ или УГГ, а также сопоставить их с кальциевыми ответами срезов коры интактных животных.

Для визуализации  $\text{Ca}^{2+}$ , связанного с мембранами и белками (Ca-c), использовали флуоресцентный зонд хлортетрацилин (Ex400/Em520). Для оценки  $\text{Ca}^{2+}$  ответа от макроучастков применялась лабораторная установка на базе контактного микроскопа ЛЮМAM-K и спектрометра AvaSpec 2048. Для вычленения роли различных типов глутаматных рецепторов применяли аппликацию на срезы их агонистов: L-глутамат (L-Glu) — неселективный агонист GluRs (50 мкМ, 2 мин), альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол-пропионат (AMPA) — селективный агонист AMPARs (40 мкМ, 2 мин), S(3-5)-дигидрокси-фенилглицин (DHPG) — селективный агонист ImGluRs (100 мкМ, 2 мин) и N-метил-D-аспартат (NMDA) — селективный агонист NMDARs (100 мкМ, 15 мин). Более подробно эта методика и результаты описаны ранее [11, 43].

На срезах коры мозга контрольных животных  $\text{Ca}^{2+}$  ответы на аппликацию L-Glu, NMDA или AMPA выражались стойкими позитивными сдвигами уровня Ca-c, а аппликация DHPG создавала кратковременное негативное смещение этого показателя (рис. 1А). Позитивные сдвиги Ca-c отражают явление входа внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  и его последующее связывание различными внутриклеточными депо и буферными системами. Снижение ответа на DHPG демонстрирует преобладание высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо, вызванного IP3-опосредованным сигналом. Эти объяснения представляются правдоподобными, так как в отдельных опытах при тех же экспериментальных условиях мы определяли  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы, используя флуоресцентный индикатор свободного  $\text{Ca}^{2+}$  — fura-2, и сопоставляли их динамику с ответами пула связанного  $\text{Ca}^{2+}$  [43].

Для оценки выраженности  $\text{Ca}^{2+}$ -ответа был проведен расчет интеграла смещения уровня Ca-c в пре-

делах от 0 до 30 мин для каждого агониста. Интегральные кальциевые ответы были рассчитаны как для контрольных срезов, так и для срезов животных переживших УГГ или ТГГ. В результате развития адаптивного процесса через сутки после УГГ интегральный  $\text{Ca}^{2+}$ -ответ на L-Glu возрастал почти на треть. В меньшей степени возрастал ответ на NMDA, и не менялся ответ на AMPA. Ответ на DHPG, сохраняя свою негативную направленность, был усилен в несколько раз по сравнению с контролем. Через сутки после ТГГ, так же как и после УГГ, отмечено усиление ответов на аппликации L-Glu. Однако ответы на AMPA и NMDA были несколько ослаблены по сравнению с контролем. Ответ же на DHPG приобрел позитивную направленность и многократно возрастал по абсолютной величине (рис. 1Б).

Сопоставление результатов двух серий опытов выявляет способность срезов повышать уровень внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в ответ на неселективную стимуляцию всех подтипов GluRs экзогенным L-глутаматом через сутки после ТГГ и особенно после УГГ. Селективная стимуляция отдельных подтипов GluRs выявляет их вклад в общую картину. Можно сделать заключение, что усиление  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов на глутамат после УГГ определяется отчасти сенситизацией NMDARs, но, в большей степени, резким усилением способности ImGluRs высвобождать  $\text{Ca}^{2+}$  из депо. Усиление же ответа на глутамат после ТГГ нельзя объяснить вкладом ионотропных рецепторов, так как их ответы были снижены. В состоянии же сигнальной системы ImGluRs, вероятно, происходит смещение акцента от IP3 опосредованного высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  к позитивной модуляции механизмов  $\text{Ca}^{2+}$ -входа. Наряду с этим следует учитывать и возможность различной экспрессии и/или транслокации белков

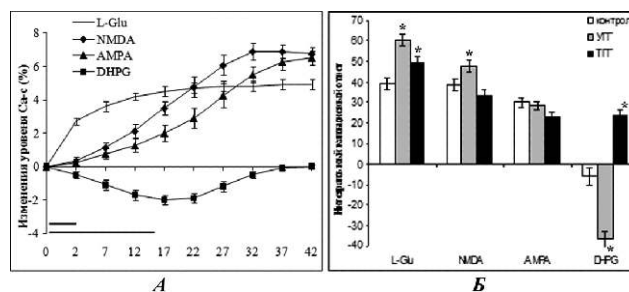


Рис. 1. Кальциевые ответы на стимуляцию различных типов глутаматных рецепторов их агонистами:

А — динамика кальциевых ответов на стимуляцию различных типов глутаматных рецепторов в срезах коры контрольных животных. По оси абсцисс время в минутах от начала аппликации. Отрезки внизу: «2 мин» — длительность аппликации L-Glu, AMPA и DHPG, «15 мин» — длительность аппликации NMDA;

Б — интегральные кальциевые ответы за интервал времени 30 мин на применение агонистов различных типов глутаматных рецепторов в срезах животных контрольных и подвергнутых УГГ или ТГГ. Звездочками отмечены достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) от соответствующих контро-

ImGluRs и ключевых элементов их сигнальных путей вслед за УГГ или ТГГ. Эти исследования были проведены нами и описываются в следующих подразделах.

### Иммуноцитохимическая оценка модификации ImGluRs и компонентов их сигнальных путей после УГГ и ТГГ

Иммуноцитохимическое исследование проводилось на парафиновых срезах мозга крыс, контрольных и перенесших УГГ или ТГГ. Для анализа экспрессии белков mGluR1 и mGluR5 использовали первичные антитела фирмы AbCam (1:100 и 1:50 соответственно); PLC $\beta$ 1 и IP3Rs — фирмы Santa-Cruz (1:100); вторичные антитела получены от фирмы Vector Labs (1:200). Визуализацию экспрессии проводили с помощью диаминобензида. Препараты анализировали под световым микроскопом Jenaval с последующим обсчетом изображений в программе ImageJ.

#### 1. Иммунореактивность mGluR1 и mGluR5 в коре мозга после УГГ и ТГГ

Выявлено, что в коре мозга контрольных животных mGluR1 и mGluR5 не колокализуются в своем распределении. Это отмечали не только в коре, но и в гиппокампе, мозжечке, таламусе и других отделах [27]. В коре mGluR1 преимущественно выявляются в телах интернейронов [26, 31]. mGluR5 равномерно распределены в нейропиле всех слоев коры [31], иногда отмечают их повышенную иммунореактивность в крупных дендритных стволах [34]. Мы проводили оценку иммунореактивности этих подтипов и в тех участках неокортекса, где они были наиболее специфично представлены, а именно, mGluR1 — в клеточных телах, а mGluR5 в дендритных стволах крупных пирамид и окружающих участках нейропила. На некоторых препаратах коры «постгипоксических», но не контрольных, животных нами наблюдалась повышенная экспрессия mGluR5 также и в телах пирамидных нейронов, в частности в перикарионе. При количественной оценке экспрессии mGluR5 в стволах апикальных дендритов крупных пирамид групп УГГ и ТГГ в сравнении с соответствующими контрольными группами было показано небольшое, но достоверное снижение уровня иммунореактивности mGluR5 (на  $0,31 \pm 0,16$  и  $0,26 \pm 0,15$  относительных единиц соответственно). Оценка иммунореактивности ImGluRs в участках нейропила, не включающих стволы апикальных дендритов, а также mGluR1 в телах нейронов V слоя не выявила существенного влияния УГГ или ТГГ на их экспрессию.

#### 2. Оценка иммунореактивности IP3Rs в коре мозга после УГГ и ТГГ

IP3Rs расположены на внутренних мембранах клетки и обнаруживаются во всех слоях коры преимущественно в пирамидных клетках [29]. Участки репрезентативных препаратов с иммунореактивностью по IP3Rs проиллюстрированы на рис. 2А. Для количественного анализа нами был выбран V слой, хотя качественные изменения были обнаружены также и в других слоях коры. Определялся уровень иммунореактивности крупных пирамид, после чего они были разделены на 3 класса по интенсивности окраски как «слабые», «умеренные» и «интенсивные» (1, 2 и 3 соответственно). На гистограммах (рис. 2Б) представлены количества клеток каждого класса в процентах от общего числа учтенных клеток в контрольных и экспериментальных группах. Гистограммы иллюстрируют снижение числа клеток с высокой плотностью IP3Rs после УГГ. После ТГГ отмечена та же, но не достоверная тенденция.

#### 3. Оценка иммунореактивности PLC в коре мозга после УГГ и ТГГ

Экспрессия PLC $\beta$ 1 определялась в V слое коры у трех экспериментальных групп животных. На рис. 3А представлены материалы, характеризующие качественные различия иммунореактивности PLC $\beta$ 1 в телах пирамидных нейронов. Для количественной оценки клетки также были разделены на классы по интенсивности окраски. Обнаружено, что после ТГГ доля слабореактивных клеток достоверно снижается,

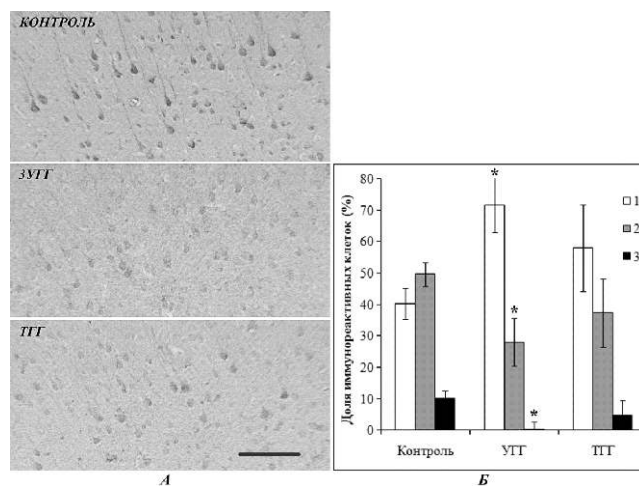


Рис. 2. Иммунореактивность IP3Rs в препаратах коры мозга: А — репрезентативные фотографии распределения иммунореактивности IP3Rs в коре контрольных и подвергнутых УГГ и ТГГ животных. Масштаб: 100 мкм; Б — диаграмма представленности трех классов иммунореактивных по IP3Rs нейронов в коре контрольных и подвергнутых УГГ и ТГГ животных. Звездочками отмечены достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) от соответствующих контролей



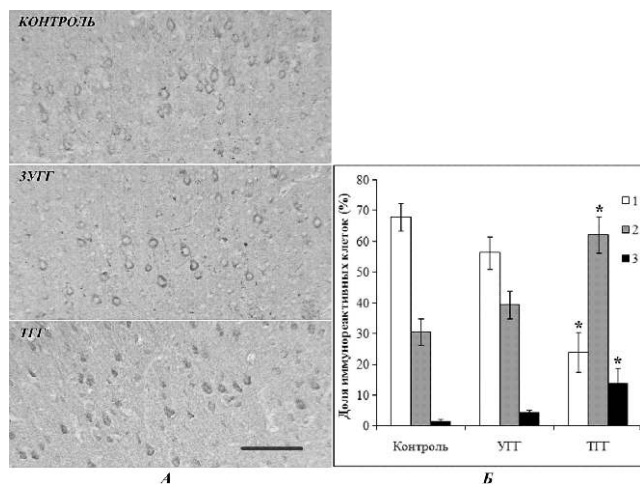


Рис. 3. Иммуореактивность PLCβ1 в препаратах коры мозга. Расположение и обозначения те же, что для рис. 2

а клеток 2 и 3 типа — увеличивается, т.е. экспрессия PLCβ1 возрастает. Сходные, но не достоверные сдвиги отмечены и после УГГ (рис. 3Б).

Сопоставление полученных нами фактов и привлечение данных литературы об участии ImGluRs в адаптивных и патологических реакциях коры мозга на гипоксию позволяют сделать следующие предварительные заключения. Функциональные состояния ImGluR — сигнальных систем после ТГГ и УГГ различаются между собой и отличаются от нормального статуса по нескольким характеристикам. В отношении их участия во внутриклеточном балансе Ca<sup>2+</sup>, обнаружено, что, если через сутки после УГГ активируемые ImGluRs обеспечивают преимущественно механизмы умеренного высвобождения Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо, то после ТГГ преобладает эффект потенциации входа экстраклеточного Ca<sup>2+</sup>. Обнаруженный паттерн Ca<sup>2+</sup>-ответа в коре животных, переживших УГГ, очевидно, нельзя объяснить ни увеличением количества ImGluRs ни повышенной экспрессией IP3Rs, так как наши данные показывают противоположные изменения иммуореактивности этих белков. УГГ стимулирует экспрессию PLCβ и, возможно, снижение синтеза IP3Rs на этом фоне является одним из компенсаторных механизмов, который ограничивает риск чрезмерного выхода Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо, ведущего к кальциевой перегрузке и/или одному из вариантов стрессорного ответа эндоплазматического ретикулума, при котором массивное высвобождение Ca<sup>2+</sup> сопровождается чередой нескольких губительных для клетки процессов. Возможно, постгипоксическое снижение экспрессии mGluR5 активация которых, предположительно, играет ведущую роль в IP3 сигналинге также направлено на предотвращение чрезмерного высвобождения

Ca<sup>2+</sup>. Следовательно, наблюдаемое после УГГ повышение Ca<sup>2+</sup>-высвобождающего эффекта стимуляции ImGluRs должно объясняться другими причинами. В их ряду следует отметить возможную апрегуляцию лигандного домена самого IP3R [22] и позитивную модуляцию сопряженности ImGluR и IP3R через систему Нотем-белков [23]. Кроме того, важную роль может играть не столько изменение числа ImGluRs, сколько модификации паттернов их транслокации между отростками и сомой, плазмолеммой и цитозолем, цитозолем и нуклеолеммой. На некоторых препаратах выявлена транслокация рецепторов после гипобарической гипоксии. Это явление может объясняться сокращением чрезмерно богатого пула плазмолеммных рецепторов путем их интернализации. Вместе с тем, транслокация ImGluRs к ядру и облегчение их воздействия на IP3Rs ядерной мембраны может играть роль в кальциевом обеспечении транскрипционной активности генов. Эти и другие возможные механизмы являются предметом дополнительных исследований. В ответ на ТГГ экспрессия PLCβ существенно возрастает, что предполагает потенциально высокий уровень образования IP3 и DAG. При этом эффект супрессии синтеза IP3Rs выражен слабее, чем после УГГ. Эти обстоятельства должны создавать ситуацию стойкого повышения концентрации внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>, характерную для патогенных последствий тяжелой гипоксии.

Заключая, следует заметить, что нами практически не рассматривается важная роль системы Akt в ImGluR-зависимых механизмах формирования долговременной толерантности мозга, индуцируемой УГГ. Изучение этих вопроса является предметом дальнейших исследований.

Работа поддержана грантами РФФИ 10-04-01134 и 11-04-00677.

### Список литературы

1. Ватаева Л.А., Тюлькова Е.И., Самойлов М.О. Влияние предварительного воздействия умеренной гипоксии на нарушения выработки и воспроизведения условной реакции пассивного избегания, вызываемые тяжелой гипобарической гипоксией у крыс // Журн. Внд. — 2004. — 54(6). — С. 795—801.
2. Миллер О.Л., Семенов Д.Г., Самойлов М.О. // Бюлл. эксп. биол. и медицины. — 2003. — 135(4). — С. 398—401.
3. Рыбникова Е.А., Хожай Л.И., Тюлькова Е.И. и др. Экспрессия белков ранних генов, структурные изменения нейронов мозга при гипобарической гипоксии и корректирующий эффект прекодиционирования // Морфол. — 2004. — 125(2). — С. 10—15.
4. Самойлов М.О. Мозг и адаптация. Молекулярно-клеточные механизмы. ИНФРАН. — СПб., 1999. — 271 с.

5. **Самойлов М.О., Рыбникова Е.А., Толькова Е.И.** и др. Влияние гипобарической гипоксии на поведенческие реакции и экспрессию ранних генов в мозге крыс: корректирующий эффект preconditionирующего воздействия // Докл. РАН. — 2001(a). — 381(1). — С. 1—3.
6. **Самойлов М.О., Лазаревич Е.В., Семенов Д.Г.** и др. Адаптивные эффекты гипоксического preconditionирования нейронов мозга // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. — 2001(6). — 87(6). — С. 714—729.
7. **Самойлов М.О., Ситник Н.А., Рыбникова Е.А.** и др. Особенности экспрессии про- и антиапоптотических белков Вах и Vcl-2 в нейронах мозга крыс в ответ на тяжелую гипобарическую гипоксию: корректирующий эффект гипоксического preconditionирования // Докл. РАН. — 2005. — 403(4). — С. 1—5.
8. **Самойлов М.О., Рыбникова Е.А., Ситник Н.А.** и др. Preconditionирование модифицирует активность митогенактивируемых протеинкиназ и транскрипционного фактора c-Jun в гиппокампе крыс вслед за тяжелой гипобарической гипоксией // Нейрохимия. — 2007. — 1(3). — С. 219—226.
9. **Семенов Д.Г., Самойлов М.О., Лазаревич Е.В.** DTNB подавляет кальциевые ответы срезов коры мозга крыс на аноксию различной длительности // Бюлл. эксп. биол. и медицины. — 2001. — 131(6). — С. 526—528.
10. **Семенов Д.Г., Миллер О.Л., Самойлов М.О.** Влияние гипоксического preconditionирования крыс *in vivo* на динамику содержания внутриклеточного кальция, индуцируемую одновременной аноксией в срезах мозга // Бюлл. эксп. биол. и медицины. — 2004. — 138(10). — С. 382—385.
11. **Семенов Д.Г., Беляков А.В., Самойлов М.О.** Сравнение Ca<sup>2+</sup> ответов на стимуляцию глутаматных рецепторов коры мозга крыс после гипобарической гипоксии // Рос. физиол. журн. им. Сеченова. — 2009. — 95(9). — С. 71—77.
12. **Строев С.А., Самойлов М.О.** Эндогенные антиоксиданты и гипоксическая толерантность мозга. ИНФРАН. — СПб., 2006. — 148 с.
13. **Allen J.W., Vicini S., Faden A.I.** Exacerbation of neuronal cell death by activation of group I metabotropic glutamate receptors: role of NMDA receptors and arachidonic acid release // Exp. Neurol. — 2001. — 169(2). — P. 449—460.
14. **Bandrowski A.E., Aramakis V.B., Moore S.L., Ashe J.H.** Metabotropic glutamate receptors modify ionotropic glutamate receptors in neocortical cells and interneurons // Exp. Brain Res. — 2001. — 136. — P. 25—40.
15. **Bano D., Nicotera P.** Ca<sup>2+</sup> signals and neuronal death in brain ischemia // Stroke. 2007. — 38(2). — P. 674—676.
16. **Baskys A., Fang L., Bayazitov I.** Activation of neuroprotective pathways by metabotropic group I glutamate receptors: a potential target for drug discovery? // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2005. — 1053. — P. 55—73.
17. **Baskys A., Bayazitov I., Zhu E.** et al. Rab-mediated endocytosis: linking neurodegeneration, neuroprotection, and synaptic plasticity? // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2007. — 1122. — P. 313—329.
18. **Berridge M.J.** Inositol trisphosphate and calcium oscillations // Biochem. Soc. Symp. — 2007. — 74. — P. 1—7.
19. **Bickler P.E., Fahlman C.S.** Moderate increases in intracellular calcium activate neuroprotective signals in hippocampal neurons // Neuroscience. — 2004. — 127. — P. 673—683.
20. **Blaabjerg M., Fang L., Zimmer J., Baskys A.** Neuroprotection against NMDA excitotoxicity by group I metabotropic glutamate receptors is associated with reduction of NMDA stimulated currents // Exp. Neurol. — 2003. — 183(2). — P. 573—580.
21. **Chong Z.Z., Kang J.-Q., Li F., Maiese K.** mGluR1 targets microglial activation and selectively prevents neuronal cell engulfment through Akt and caspase dependent pathways // Curr. Neurovasc. Res. — 2005. — 2(3). — P. 197—211.
22. **Devogelaere B., Verbert L., Parys J.B.** et al. The complex regulatory function of the ligand-binding domain of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor // Cell Calcium. — 2008. — 43. — P. 17—27.
23. **Duncan R.S., Hwang S.Y., Koulen P.** Effects of Ves1/Homer proteins on intracellular signaling // Exp. Biol. Med. (Maywood). — 2005. — 230(8). — P. 527—535.
24. **Duncan R.S., Goad D.L., Grillo M.A.** et al. Control of Intracellular Calcium Signaling as a Neuroprotective Strategy // Molecules. — 2011. — 15(3). — P. 1168—1195.
25. **Faden A.I., O'Leary D.M., Fan L.** et al. Selective blockade of the mGluR1 receptor reduces traumatic neuronal injury *in vitro* and improves outcome after brain trauma // Exp. Neurol. — 2001. — 167(2). — P. 435—444.
26. **Ferraguti F., Conquet F., Corti C.** et al. Immunohistochemical localization of the mGluR1beta metabotropic glutamate receptor in the adult rodent forebrain: evidence for a differential distribution of mGluR1 splice variants // J. Comp. Neurol. — 1998. — 400(3). — P. 391—407.
27. **Ferraguti F., Shigemoto R.** Metabotropic glutamate receptors // Cell Tissue Res. — 2006. — 326. — P. 483—504.
28. **Foa L., Gasperini R.** Developmental roles for Homer: more than just a pretty scaffold // J. of Neurochem. — 2009. — 108. — P. 1—10.
29. **Fotuhi M., Sharp A.H., Glatt C.E.** et al. Differential localization of phospho-inositide-linked metabotropic glutamate receptor (mGluR1) and the Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in rat brain // J. of Neurosci. — 1993. — 13(5). — P. 2001—2012.
30. **Kalda A., Kaasik A., Vassiljev V.** et al. Neuroprotective action of group I metabotropic glutamate receptor agonists against oxygen-glucose deprivation-induced neuronal death // Brain Res. — 2000. — 853(2). — P. 370—373.
31. **Lopez-Bendito G., Shigemoto R., Fairen A., Lujan R.** Differential distribution of group I metabotropic glutamate receptors during rat cortex development // Cerebr. Cortex. — 2002. — 12. — P. 625—638.
32. **Pellegrini-Giampietro D.E., Cozzi A., Peruginelli F.** et al. 1-Aminoindan-1,5-dicarboxylic acid and (S)-(+)-2-(3-carboxybicyclo [1.1.1]pentyl)- glycine, two mGlu1 receptor-preferring antagonists, reduce neuronal death in *in vitro* and *in vivo* models of cerebral ischemia // Eur. J. Neurosci. — 1999. — 11. — P. 3637—3647.
33. **Perez-Pinzon M., Born J., Centeno J.** Ca<sup>2+</sup> and increase excitability promote tolerance against anoxia in hippocampal slices // Brain Res. — 1999. — 833(1). — P. 20—26.
34. **Romano C., Sesma M., McDonald C.** et al. Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in rat brain // J. Comp. Neurol. — 1995. — 355(3). — P. 455—469.
35. **Rong R., Ahn J.Y., Huang H.** et al. PI3 kinase enhancer-Homer complex couples mGluR1 to PI3 kinase, preventing neuronal apoptosis // Nat. Neurosci. — 2003. — 6(11). — P. 1153—1161.
36. **Rybnikova E., Vataeva L., Tyulkova E.** et al. Mild hypoxia preconditioning prevents impairment of passive avoidance learning and suppression of brain NGFI-A expression induced by severe hypoxia // Behav. Brain Res. — 2005. — 160. — P. 107—114.
37. **Rybnikova E., Sitnik N., Glushchenko T.** et al. The preconditioning modified neuronal expression of apoptosis-related proteins of Bcl-2 superfamily following severe hypobaric hypoxia in rats // Brain Research. — 2006. — 1089. — P. 195—202.

38. *Rybnikova E., Glushchenko T., Tjul'kova E.* et al. Preconditioning induces prolonged expression of transcription factors pCREB and NF-kappa B in the neocortex of rat before and following severe hypobaric hypoxia // *J. Neurochem.* — 2008. — 106(3). — P. 1450—1458.
39. *Scartabelli T., Gerace E., Landucci E.* et al. Neuroprotection by group I mGlu receptors in a rat hippocampal slice model of cerebral ischemia is associated with the PI3K-Akt signaling pathway: a novel preconditioning strategy? // *Neuropharmacology.* — 2008. — 55(4). — P. 509—516.
40. *Schaller B., Graf R.* Cerebral ischemic preconditioning. An experimental phenomenon or a clinically important entity of stroke prevention? // *Neurol.* — 2002. — 249. — P. 1503—1511.
41. *Semenov D.G., Samoilo M.O., Zelonka P., Lazarewicz J.* Responses to reversible anoxia of intracellular free and bound  $Ca^{2+}$  in rat cortical slices // *Resuscitation.* — 2000. — 44. — P. 207—214.
42. *Semenov D., Samoilo M., Lazarewicz J.* Calcium transients in the model of rapidly induced anoxic tolerance in rat cortical slices: involvement of NMDA receptors // *Neurosignals.* — 2002. — 11. — P. 329—335.
43. *Semenov D.G., Samoilo M.O., Lazarewicz J.W.* Preconditioning reduces hypoxia-evoked alterations in glutamatergic  $Ca^{2+}$  signaling in rat cortex // *Acta Neurobiol. Exp.* — 2008. — 68. — P. 169—179.
44. *Skeberdis V.A., Lan J., Opitz T.* et al. mGluR1 — mediated potentiation of NMDA receptors involves a rise in intracellular calcium and activation of protein kinase C // *Neuropharm.* — 2001. — 40. — P. 856—865.
45. *Snyder E., Philpot B., Huber K.* et al. Internalization of ionotropic glutamate receptors in response to mGluR activation // *Nat. Neurosci.* — 2001. — 4(11). — P. 1079—1085.
46. *Szabo T., Vanderheyden V., Parys J.B.* et al. Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by protein kinase B/Akt inhibits  $Ca^{2+}$  release and apoptosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2008. — 105(7). — P. 2427—2432.
47. *Verkhatsky A., Toescu E.C.* Endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  homeostasis and neuronal death // *J. Cell. Mol. Med.* — 2003. — 7(4). — P. 351—361.
48. *Vincent A.M., Maiese K.* The metabotropic glutamate system promotes neuronal survival through distinct pathways of programmed cell death // *Exp. Neurol.* — 2000. — 166(1). — P. 65—82.
49. *Wang R.M., Yang F., Zhang Y.X.* Preconditioning-induced activation of ERK5 is dependent on moderate  $Ca^{2+}$  influx via NMDA receptors and contributes to ischemic tolerance in the hippocampal CA1 region of rats // *Life Sci.* — 2006. — 79(19). — P. 1839—1846.
50. *Yano S., Morioka M., Kuratsu J., Fukunaga K.* Functional proteins involved in regulation of intracellular  $Ca^{2+}$  for drug development: role of calcium/calmodulin-dependent protein kinases in ischemic neuronal death // *J. Pharmacol. Sci.* — 2005. — 97. — P. 351—354.
51. *Ye K., Snyder S.H.* PIKE GTPase: a novel mediator of phosphoinositide signaling // *J. Cell Sci.* — 2004. — 117. — P. 155—161.

Поступила 21.03.12

#### Сведения об авторах:

*Беляков Александр Витальевич*, канд. биол. наук, науч. сотр., лаб. регуляции функции нейронов мозга ФГБУН ИФ им. И.П. Павлова РАН

*Глушченко Татьяна Сергеевна*, канд. биол. наук, старш. науч. сотр., лаб. регуляции функции нейронов мозга ФГБУН ИФ им. И.П. Павлова РАН

*Самойлов Михаил Олегович*, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. регуляции функции нейронов мозга, зам. директора ФГБУН ИФ им. И.П. Павлова РАН

К.Н. Белослудцев<sup>1,2</sup>, Г.Д. Миронова<sup>1,2</sup>

## **Митохондриальная липидная пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированная пора и её возможная роль в деградации нервных клеток**

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» Российской академии наук, 142290, Московская обл., Пушкино, ул. Институтская, 3

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пушкинский государственный естественнонаучный институт», 142290, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 3

*В обзоре обсуждается новый тип митохондриальной поры, имеющей липидную природу и индуцируемую пальмитиновой кислотой и  $\text{Ca}^{2+}$ . Рассмотрены молекулярные механизмы образования и регуляции этой поры, возможность ее образования в биологических мембранах и роль в физиологических и патофизиологических процессах. Обсуждается возможная роль липидной поры в глутамат-индуцированной деградации нервных клеток.*

**Ключевые слова:** митохондрии, пальмитиновая кислота, липидная пора, деградация нервных клеток

K.N. Belosludtsev<sup>1,2</sup>, G.D. Mironova<sup>1,2</sup>

## **The mitochondrial lipid palmitate/ $\text{Ca}^{2+}$ -induced pore and its possible role in a degradation of nervous cells**

<sup>1</sup> Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy Science, 3, Institutskaya str., Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia

<sup>2</sup> Pushchino State Institute of Natural Sciences, 3, Prospekt Nauki, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia

*The subject of the review is a new type of mitochondrial pore — a pore which has lipid nature and is induced by palmitic acid and  $\text{Ca}^{2+}$ . The review considers molecular mechanisms of its formation and regulation, conditions of its opening in biological membranes and the role in physiological and pathophysiological processes. Also discussed is involvement of the lipid pore in glutamate-induced degradation of nervous cells.*

**Key words:** Mitochondria, palmitic acid, lipid pore, neurodegradation

Известно, что гормоны и медиаторы, участвующие в клеточной сигнализации, запускают целый каскад реакций, заканчивающийся во многих случаях активацией того или иного ионного канала или поры и поступление ионов в цитоплазму клетки. Некоторые рецепторы, как, например, глутаматный (NMDA подтип), сами являются ионными каналами. Глутамат, связываясь со своим рецептором, изменяет его конформацию, в результате чего канал открывается и  $\text{Ca}^{2+}$  поступает в клетку. Так как концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в межклеточном пространстве значительно выше, чем в цитоплазме, ион устремляется в клетку. При этом, активируются соответствующие процессы внутриклеточной сигнализации. Медиаторы действуют обычно в течение непродолжительного времени, после чего ионный гомеостаз клетки восстанавливается до исходного уровня, в основном, за счёт поступления иона в кле-

точные депо (эндоплазматический ретикулум и митохондрии) [25, 37].

Однако при определённых патологиях, наблюдается чрезмерное поступление медиаторов в межклеточное пространство, что ведёт к длительной стимуляции клеток. Увеличение экстраклеточного глутамата, например, приводит к длительной стимуляции NMDA рецептора и как результат — длительное поступление  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку, что является для неё токсичным [38], так как ведёт к накоплению иона в митохондриях, в основном, в виде  $\text{Ca}^{2+}$ -фосфатных солей. После исчерпания митохондриями способности связывать ион, в их матриксе накапливается свободный кальций, что ведёт к открытию  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых неспецифических пор. Открытие пор приводит к выбросу  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий, падению мембранного потенциала и увеличению объёма их матрикса. При этом из митохондрий в цитоплазму выходят проапоптотические белки, что, в свою очередь, служит причиной запуска процессов апоптоза и некроза клеток [21, 24, 30, 37, 38]. Все перечисленные выше процессы

**Для корреспонденции:** Константин Николаевич Белослудцев, канд.биол.наук, старш. науч. сотр., лаб. митохондриального транспорта ФГУН ИТЭБ РАН, старш. науч. сотр. ФГБОУ ВПО ПушГЕНИ. E-mail: bekonik@gmail.com

лежат в основе деградации клеток при ишемии, окислительном стрессе, эпилепсии, нейродегенеративных заболеваниях и других патологиях [29, 37].

Механизм токсического действия ряда медиаторов до сих пор не ясен. Предполагалось, что инициируемое ими долгосрочное повышение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме с последующим выбросом ионов из митохондрий связан с формированием в них белкового мегаканала, так называемой циклоспорин А (ЦсА)-чувствительной митохондриальной поры (Mitochondrial Permeability Transition pore, МРТ). Однако участие этой поры в развитии токсического действия медиаторов дискуссионно, а в ряде исследований были обнаружены факты, поставившие под сомнения эту гипотезу [17, 18, 29, 40, 49, 50]. Сопоставление наших и литературных данных позволило предположить, что в основе ряда механизмов  $\text{Ca}^{2+}$  дисрегуляции (вторичного выхода иона из митохондрий), может лежать открытие в их внутренней мембране ЦсА-нечувствительной липидной поры, которая изучается в нашей лаборатории на протяжении последних 15 лет [3—5, 7, 8, 10, 12—15, 27, 29, 33—36].

### *Жирные кислоты как индукторы неспецифической проницаемости липидного бислоя*

Исследования липидной поры начались в нашей лаборатории в середине 90-х годов прошлого века с обнаружения нового « $\text{Ca}^{2+}$  сенсора» для МРТ поры в липидной фракции экстракта митохондрий, полученной при выделении ионных каналов [33]. Из этой фракции был выделен гидрофобный компонент, обладающий высоким сродством к  $\text{Ca}^{2+}$ . Добавление этого компонента к бислойным липидным мембранам (БЛМ) приводило к образованию в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  неселективных ионных каналов [27, 33]. Это соединение было локализовано преимущественно в контактных сайтах [34], т.е. там, где внутренняя и внешняя митохондриальная мембраны находятся в тесном контакте, и где расположено большинство мембранных транспортирующих систем.

Исследования показали, что гидрофобный  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающий компонент — это смесь насыщенных длинноцепочечных свободных жирных кислот, в основном, пальмитиновой и стеариновой [34]. Для выяснения, какие липиды кроме пальмитиновой и стеариновой жирных кислот способны прочно связывать

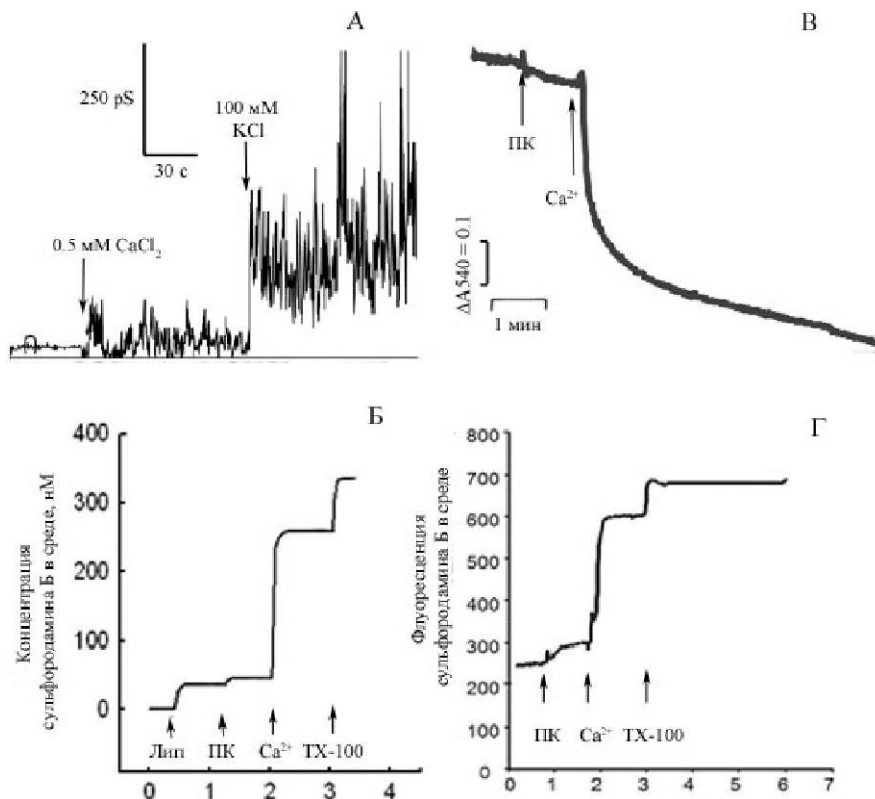


Рис. 1. Пальмитиновая кислота (ПК) индуцирует  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую проницаемость в искусственных (А — БЛМ; Б — липосомы) и биологических (В — митохондрии печени крыс; Г — плазматическая мембрана эритроцитов) мембранах:

А — влияние ПК (0,5 массовых %) и  $\text{Ca}^{2+}$  на проводимость БЛМ (потенциал на мембране 100 мВ); Б — 50 мкМ ПК и 1 мМ  $\text{CaCl}_2$  индуцируют выход флуоресцентного зонда сульфородамина Б из липосом; В — набухание митохондрий печени крыс, индуцированное 15 мкМ ПК и 30 мкМ  $\text{CaCl}_2$ ; Г — 50 мкМ ПК и 0,5 мМ  $\text{CaCl}_2$  индуцируют выход сульфородамина Б из эритроцитов

Ca<sup>2+</sup>, были протестированы 25 липидов различных классов. Как следует из таблицы, только насыщенные длинноцепочечные свободные жирные кислоты связывают Ca<sup>2+</sup> со сродством, которое на 1—2 порядка выше, чем сродство к этому иону других жирных кислот и липидов (K<sub>d</sub> для пальмитиновой кислоты = 5 мкМ при рН 8.5) [34]. Было установлено, что коммерческие пальмитиновая и стеариновая кислоты, в отличие от ненасыщенных жирных кислот, индуцировали неспецифическую Ca<sup>2+</sup>-зависимую ионную проницаемость БЛМ [34]. Эти же кислоты способны индуцировать неспецифическую Ca<sup>2+</sup>-индуцируемую проницаемость в липосомах [8, 12, 13]. Насыщенные жирные кислоты в присутствии Ca<sup>2+</sup> способны индуцировать не только проницаемость БЛМ и липосомальной мембраны, но и неспецифическую нечувствительную к циклоспорино А проницаемость внутренней мембраны митохондрий, выделенных из разных тканей (печень, сердце, мозг), а также из мембраны эритроцитов [3, 5, 7, 8, 13, 15, 16, 34, 46, 47] (рис. 1).

Как видно из результатов исследований, пальмитат-индуцированная Ca<sup>2+</sup>-зависимая неспецифическая проницаемость наблюдалась во многих бислоенных мембранах. Поэтому возникли закономерные вопросы:

1) об одной и той же проницаемости идет речь в случае искусственных и в случае нативных биологических мембран;

2) по какому механизму происходит индукция этой проницаемости.

Для того, чтобы ответить на первый вопрос были проведены исследования по влиянию одних и тех же агентов на индукцию неспецифической пальмитат/Ca<sup>2+</sup>-зависимой проницаемости (поры) в исследуемых липидных мембранах. Во-первых, было показано, что хелатирование Ca<sup>2+</sup> (ЭГТА и АТФ) или связывание пальмитиновой кислоты (бычий сывороточный альбумин) подавляют индукцию неспецифической пальмитат/Ca<sup>2+</sup>-индуцированной поры во всех исследуемых мембранах [3, 5, 7, 36]. Во-вторых, загрузка митохондриальных и липосомальной

Таблица 1

Связывание Ca<sup>2+</sup> различными липидами и свободными жирными кислотами [15]

Липиды и жирные кислоты	Связывание Ca <sup>2+</sup> *
Лауриновая кислота (12:0)	0,50±0,03
Миристиновая кислота (14:0)	7,30±0,25
Пальмитиновая кислота (16:0)	83,00±0,75
Стеариновая кислота (18:0)	100,00
Арахидоновая кислота (20:0)	73,00±2,5
Докозановая кислота (22:0)	44,00±1,2
Лигноцериновая кислота (24:0)	15,00±0,35
Пальмитолеиновая кислота (16:1)	1,90±0,08
Олеиновая кислота (18:1)	5,70±0,12
Линолевая кислота (18:2)	0,65±0,04
Линоленовая кислота (18:3)	0,87±0,05
Арахидоновая кислота (20:4)	1,10±0,05
1-Пальмитоил-лизосфатидилхолин	0,43±0,02
1-Стеароил-лизосфатидилхолин	0,47±0,02
1-Лауроил-лизосфатидилхолин	0,43±0,01
Лизосфатидилсерин	0,54±0,03
1,2-Дипальмитоил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфатидилхолин	0,40±0,2
1,2-Дипальмитоил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфатидилэтанолламин	0,22±0,01
1-Пальмитоил- <i>sn</i> -глицеро-1-3-фосфатидилэтанолламин	0,76±0,03
Пальмитоил-КоА	0,43±0,02
Кардиолипин	0,60±0,03
L-α-фосфатидная кислота	19,50±0,8
Холестерин	0,33±0,01
Цереброзиды	0,20±0,01
Сфингомиелин	0,30±0,01

Примечание. \* — % от связывания Ca<sup>2+</sup> со стеариновой кислотой

мембран холестерина (основной модификатор бислоевых мембран) приводила к одинаковому увеличению скорости формирования пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированной поры [6, 7]. В-третьих, загрузка липосом кардиолипином приводила к усилению пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированной проницаемости, а связывание кардиолипина в митохондриях специфическим агентом нонил акридиновым оранжевым вызывало полное ингибирование образования поры в митохондриях [7, 14]. Все это говорит о том, что проницаемость, индуцированная пальмитиновой кислотой и кальцием в биологических мембранах по структуре аналогична той, которая индуцируется в искусственных мембранах, т.е. изучаемая нами в биологических мембранах пора имеет липидную природу.

Для того, чтобы ответить на вопрос о механизме, по которому происходит индукция пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой проницаемости, необходимо в первую очередь определиться, что лежит в основе этой индукции. Согласно развиваемым нами представлениям, в основе индукции пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры в искусственных и биологических мембранах лежит формирование комплексов жирной кислоты с  $\text{Ca}^{2+}$ . Только насыщенные жирные кислоты, которые связывают  $\text{Ca}^{2+}$  с высоким сродством (табл. 1), способны индуцировать неспецифическую  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую проницаемость искусственных (БЛМ и липосомы) и биологических мембран (внутренняя мембрана митохондрий и плазматическая мембрана эритроцитов). Ненасыщенные жирные кислоты и, в частности олеиновая и арахидоновая кислоты, которые практически не образуют прочные комплексы с  $\text{Ca}^{2+}$ , не способны индуцировать образование поры в искусственных мембранах, митохондриях и эритроцитах [3, 12, 16, 34, 47].

Помимо  $\text{Ca}^{2+}$  другие двухвалентные металлы также способны вызывать открытие пальмитат-зависимой поры. В экспериментах на липосомах и эритроцитах было показано, что  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  и др. металлы практически также эффективны в ин-

дукции пальмитат-зависимой поры, как и  $\text{Ca}^{2+}$  [12, 16]. В то же время, в митохондриях индуцировать открытие липидной поры помимо  $\text{Ca}^{2+}$  с той же эффективностью может только  $\text{Sr}^{2+}$ , который способен транспортироваться в митохондрии по  $\text{Ca}^{2+}$  унипортеру [5, 46]. Это означает, что для индукции поры важно именно комплексобразование анионов жирной кислоты с каким-либо двухвалентным катионом, а для митохондрий необходимо также ещё транспорт этих катионов в матрикс.

Эти исследования позволили предположить общий универсальный механизм образования пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированной проницаемости (поры) во всех видах бислоевых мембран.

#### *Механизм образования липидной поры, индуцированной жирными кислотами и $\text{Ca}^{2+}$*

Согласно экспериментам, проведенным на липосомах с применением флуоресцентных зондов [12, 13], пальмитиновая кислота и  $\text{Ca}^{2+}$  индуцируют открытие липидной поры, а механизм образования этой поры связан с хемотропным фазовым переходом в липидном бислое (рис. 2).

Как показано на рис. 2, связывание  $\text{Ca}^{2+}$  с анионами пальмитиновой кислоты, находящейся в мембране, будет приводить к фазовой сегрегации комплексов ПК/ $\text{Ca}^{2+}$  в отдельные твердокристаллические мембранные домены (*стадия 1 n 2*) (рис. 2). Отвердевание жирнокислотных доменов в мембране будет сопровождаться сокращением их площади — за счет того, что упаковка углеводородных цепей в твердо-кристаллической фазе более компактна, чем в жидко-кристаллической фазе [28, 44]. Монослой, в котором произошла сегрегация комплексов пальмитиновой кислоты с  $\text{Ca}^{2+}$ , окажется растянутым (то есть, в нем возрастет сила латерального натяжения), а противоположный монослой — сжатым (в нем увеличится сила латерального давления). Таким образом, в мембране возникнет межслойный дисбаланс сил латерального давления/натяжения, что приведет

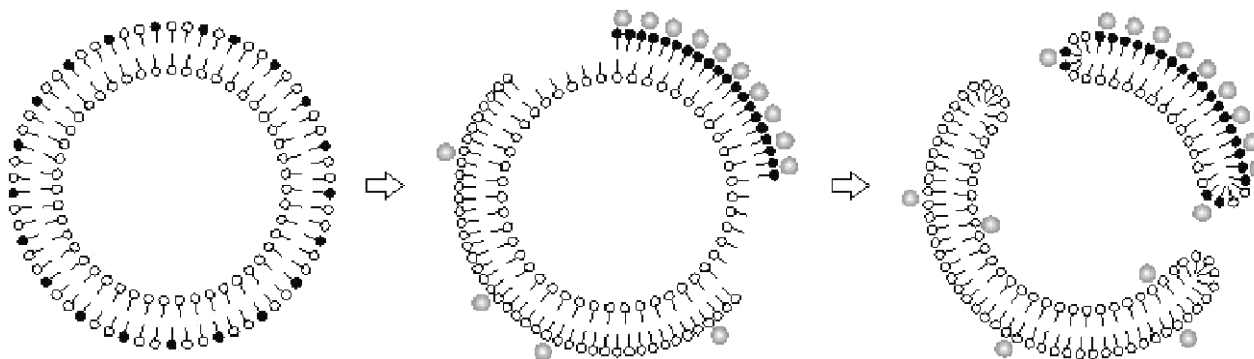


Рис. 2. Механизм образования гидрофильной липидной поры в мембране липосом при хемотропном фазовом переходе (Agafonov et al., 2007)

к разрыву растянутого монослоя (стадия 2). Углеводородные цепи липидов в месте разрыва окажутся экспонированными в водную среду, что термодинамически крайне невыгодно. Поэтому сжатый монослой также разорвется, и края монослоев по периметру разрыва сомкнутся — возникнет гидрофильная липидная пора (стадия 3) [8, 13].

Следует подчеркнуть, что речь здесь идет именно о поре в мембране, а не о разрушении (мицеллизации) липосом, вследствие «детергеноподобного» эффекта пальмитиновой кислоты или ее комплексов с  $\text{Ca}^{2+}$ . При использовании метода флуоресцентной корреляционной спектроскопии было продемонстрировано, что после того, как произошло открытие пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированной поры, радиус везикул практически не изменяется, мицеллы не образуются, и целостность мембраны восстанавливается [12].

Следует отметить также, что образование крупных гидрофильных пор в липидном бислое мембран не является редким явлением. Липидные поры могут образовываться в результате осмотического шока (как, например, при гемолизе эритроцитов [41]) электрического пробоя мембран [9, 11], а также при фазовом переходе в липидном бислое [1, 2]. Это предполагает, что липидные поры, такие как митохондриальная пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированная пора, могут принимать участие в ряде клеточных процессах.

*Митохондриальная  
пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированная липидная пора:  
её свойства и регуляция*

До недавнего времени в биоэнергетике господствовала точка зрения о том, что в митохондриях в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  и ряда других агентов может быть индуцировано открытие неспецифической поры, известной как Mitochondrial Permeability Transition pore, представляющей собой белковый мегаканал. В состав этого канала входят аденилаттранслокатор, порин, циклофилин D и ряд других мембранных митохондриальных белков [52, 53]. Открытие этой поры ингибировалось циклоспорином А. Способность жирных кислот индуцировать открытие  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительной МРТ поры известна давно. Их действие объяснялось и протонотормным эффектом, и взаимодействием с основной структурной единицей МРТ — аденилаттранслокатором [19, 51]. Однако влияние жирных кислот всегда наблюдалось на фоне какого-либо из индукторов митохондриальной поры (неорганического фосфата, окислителей и др.), поэтому оценить их собственный вклад в этот процесс было достаточно сложно.

Между тем, как было показано выше, длинноцепочечные насыщенные жирные кислоты в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  способны индуцировать образование друго-

го типа пор, имеющих липидную природу, и в их функционировании белковые молекулы не принимали участия [3, 5, 46, 47]. Исходя из механизма образования липидной поры, индуцированной пальмитиновой кислотой и  $\text{Ca}^{2+}$ , молекулярные механизмы регуляции этой поры в митохондриальной мембране, а также ее свойства должны значительно различаться с механизмами регуляции и свойствами белковой МРТ поры.

Согласно полученным данным, на открытие митохондриальной липидной поры не влияют модуляторы  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительной белковой МРТ поры. Как показано на рис. 3, ингибиторы ( $\text{Ca}^{2+}$ , АДФ, дитиотреитол) и активаторы (атрактилозид, неорганический фосфат, тимеросал) МРТ поры не влияют на набухание митохондрий, индуцированное пальмитатом и  $\text{Ca}^{2+}$  [5, 7, 46].

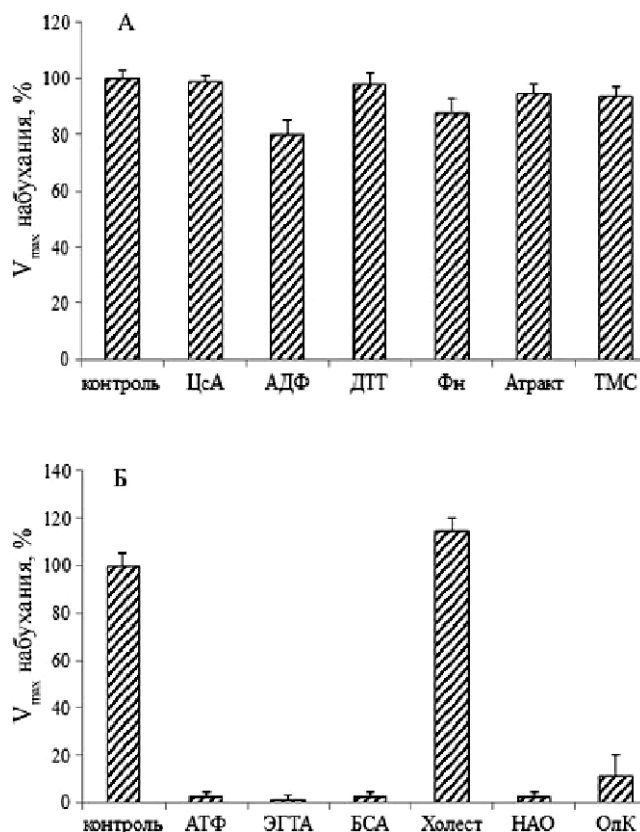


Рис. 3. Влияние различных модуляторов МРТ поры (а) и модуляторов пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированной поры (б) на пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированное набухание митохондрий печени крыс. Набухание индуцировалось 15 мкМ ПК и 30 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$ .

Модуляторы: А — 1 мкМ ЦсА, 3 мМ АДФ, 2 мМ дитиотреитол, 1 мМ неорганический фосфат, 50 мкМ атрактилозид, 50 мкМ тимеросал; Б — 3 мМ АТФ, 1 мМ ЭГТА, 2 мг/мл бычий сывороточный альбумин, холестерин (15 мольных %, концентрация ПК 20 мкМ и 30 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$ ), 6 мкМ нонил акридиноый оранжевый, 15 мкМ олеиновая кислота



В то же время, как показано выше, связывание молекул  $\text{Ca}^{2+}$  и жирной кислоты, а также модификация мембран липидами приводили к изменению вероятности образования пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированной поры в митохондриях [5, 7, 36, 46]. Ненасыщенные жирные кислоты, в отличие от насыщенных, не способны индуцировать образование липидной митохондриальной поры [3, 5, 47]. Это является также отличием липидной поры от МРТ. Было показано, что ЦсА-чувствительную МРТ пору способны индуцировать любые жирные кислоты. В то же время, присутствие в мембране ненасыщенных жирных кислот снижает вероятность открытия в митохондриях липидной пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированной поры [7, 14, 47].

Для открытия пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированной поры во внутренней митохондриальной мембране необходимо присутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриальном матриксе. Было показано, что ингибиторы митохондриального  $\text{Ca}^{2+}$  унипортера — рутений красный и лантан, а также деполяризация внутренней митохондриальной мембраны (что препятствует  $\text{Ca}^{2+}$  транспорту по электрофоретическому  $\text{Ca}^{2+}$  унипортеру) предотвращают образование липидной пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированной поры [36, 46]. Таким образом, важным фактором для образования поры является энергизация митохондриальной мембраны, которая, обеспечивает создание с матриксной стороны внутренней митохондриальной мембраны благоприятных условий для образования поры (локально-высокие концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  и жирной кислоты). В отличие от этого при индукции МРТ поры благоприятным процессом является деполяризация внутренней митохондриальной мембраны [46].

Стоит еще раз подчеркнуть, что помимо  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцировать образование липидной пальмитат-зависимой митохондриальной поры с той же эффективностью могут  $\text{Sr}^{2+}$  и гораздо слабее  $\text{Ba}^{2+}$  — ионы, способные транспортироваться в митохондрии по  $\text{Ca}^{2+}$  унипортеру. Это свойство липидной поры является еще одним отличием от МРТ поры, открытие которой способен индуцировать только  $\text{Ca}^{2+}$  [46].

Одно из самых важных свойств липидных пор является их способность самопроизвольно закрываться, «затекать», если их радиус не превышает некоторой критической величины (для жидкокристаллического бислоя — 9 нм); при этом достаточно быстро (доли секунды) целостность мембраны восстанавливается [2]. Этим свойством обладает и пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированная пора, т.е. она является короткоживущей. Было показано, что размер пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированной поры немного больше размера МРТ поры, радиус которой — 2—3 нм. В экспериментах на липосомах и митохондриях было показано, что после открытия липидной поры со временем происходит ее закрытие и целостность мембраны восстанавливается, чего не наблюдается при открытии

МРТ [8, 12, 46]. Существенно, что при открытии липидной поры, в случае дальнейшего добавления ингибитора входа  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондрии (рутеиниевого красного) наблюдается восстановление мембранного потенциала, чего также не наблюдается при открытии МРТ [35, 36]. Способность митохондрий нормально функционировать после открытия-закрытия поры является важной для многих физиологических и патофизиологических процессов, например для индукции апоптоза [31].

*Возможность индукции митохондриальной липидной пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры в физиологических условиях и при патологиях*

Возможность индукции липидной пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированной поры в митохондриях различных тканей целиком зависит от наличия индукторов. Концентрация  $\text{Ca}^{2+}$ , при которой на выделенных митохондриях печени наблюдается индукция пальмитат-зависимого набухания значительно меньше того количества  $\text{Ca}^{2+}$ , которое требуется для открытия ЦсА-чувствительной МРТ поры [3, 46, 47]. В то же время, эта концентрация все же выше той, которая устанавливается в клетке даже при патологиях. Однако локально высокие концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке могут наблюдаться в микродоменах между митохондриями и эндоплазматическим ретикулулом [42], что будет способствовать индукции липидной пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированной поры.

Согласно полученным в нашей лаборатории данным [8], основными свободными жирными кислотами в мембране митохондрий печени крыс являются пальмитиновая, стеариновая и олеиновая кислоты, и их процентное молярное содержание среди общих липидов составляет соответственно 6,61, 6,45 и 5,06% (табл. 2). В экспериментах по индукции пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры набухание митохондрий печени наблюдалось при добавлении в среду 30 нмоль пальмитиновой кислоты/мг белка [3], что соответствует повышению содержания ПК в мембране примерно на 5% (от общего содержания липидов) [8]. Следовательно, суммарное содержание основных длинноцепочечных насыщенных свободных жирных кислот (пальмитиновой и стеариновой кислот), при котором индуцируется  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимое набухание митохондрий составляет примерно 17—18% (молярных). Следовательно, увеличение концентрации ПК в митохондриальной мембране менее чем в 2 раза приведет к возникновению липидных пор [8].

Таким образом, в норме суммарное содержание длинноцепочечных насыщенных свободных жирных кислот в мембране митохондрий близко к некоему пороговому уровню, выше которого в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  индуцируется образование липидных пор. Известно, что содержание  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке существенно возрастает при

Состав свободных жирных кислот (СЖК) в мембранах митохондрий [17]

СЖК	Содержание СЖК	
	мкг/мг белка	% (моль/моль) от суммарного количества липидов
14:0	0,89	0,65
16:0	10,14	6,61
16:1 n-9	0,17	0,10
16:1 n-7	0,11	0,06
18:0	10,98	6,45
18:1 n-9	8,47	5,06
18:1 n-7	0,00	0,00
18:2 n-6	3,79	2,25
18:3 n-3	0,21	0,11
20:0	0,40	0,20
20:3 n-6	0,10	0,05
22:0	3,02	1,46
20:4 n-6	0,10	0,05
20:5 n-3	0,28	0,15
24:0	0,14	0,05
22:4 n-6	2,21	1,10
22:5 n-6	0,14	0,06
22:5 n-3	0,12	0,05
22:6 n-3	0,21	0,10

Таблица 3

Содержание свободной и связанной пальмитиновой кислоты (ПК) в клетках линий WENI-164 и С6 [17]

Липиды	ПК в составе липидов (мкг/мкг Р <sub>i</sub> )		Свободная ПК в митохондриях (мкг/мг белка)	
	С6	WENI-164	С6	WENI-164
	—	—	7,1	17,5
Фосфатидилхолин	6,1	5,8		
Фосфатидилэтаноламин	1,1	1,7		
Сфингомиелин	4,3	5,4		
Кардиолипин	0,51	4,08		

самых различных патологических и стрессовых ситуациях, что способствует дополнительному повышению содержания свободных жирных кислот в клеточных мембранах — за счет активации фосфолипаз. Следует отметить, что  $\text{Ca}^{2+}$ , а также и  $\text{Sr}^{2+}$ , могут активировать митохондриальную фосфолипазу  $A_2$  [26, 43]. Поэтому содержание свободных жирных кислот в клеточных мембранах может существенно возрасти при развитии различных патологических процессов. Безусловно, основным продуктом фосфолипазы  $A_2$  является арахидоновая кислота, которая локализуется в фосфолипиде преимущественно по положению 2. Однако помимо арахидоновой кислоты при перегрузке митохондрий  $\text{Ca}^{2+}$  или при окислительном стрессе активация фосфолипазы  $A_2$  приводит к накоплению и других жирных кислот, в том числе и насыщенных — пальмитиновой, стеариновой и миристиновой [23, 32, 34, 39, 48]. Это

может происходить вследствие того, что эти жирные кислоты также могут локализоваться во 2 положении фосфолипида [8]. Общеизвестно, что насыщенные жирные кислоты локализуются преимущественно в 1 положении фосфолипидов, но они могут появляться вследствие лизофосфолипидной активности фосфолипазы  $A_2$  [23, 39].

Интересно, что в некоторых клеточных линиях содержание пальмитиновой и стеариновой кислот, находящихся как в свободном, так и связанном состоянии увеличено. Так, в клеточной линии WENI-164, чувствительной к фактору некроза опухолей (то есть, клетки, склонные к апоптозу) наблюдается [35] увеличенное содержание как свободной, так и находящейся в составе фосфолипидов пальмитиновой кислоты по сравнению с клетками линии С6, нечувствительной к фактору некроза опухолей (табл. 3).

Таким образом, возможный механизм образования и функционирования митохондриальной липидной поры при различных патофизиологических условиях может выглядеть следующим образом (рис. 4). При различных стрессовых стимулах избыточное количество  $Ca^{2+}$  будет поступать в митохондрии по  $Ca^{2+}$  унипортеру. Накопление в митохондриях свободного  $Ca^{2+}$  приведет к активации фосфолипазы  $A_2$  и появлению в мембране жирных кислот (в том числе и пальмитиновой). Таким образом, на матричной стороне внутренней митохондриальной мембраны создаются благоприятные условия для образования комплексов  $Ca^{2+}$  с жирной кислотой. Как только концентрация комплексов  $Ca^{2+}$  с кислотой превысит некоторую критическую величину, начнется процесс фазовой сегрегации этих комплексов, что приведет к образованию липидных пор — по механизму, который уже рассматривался выше.

Кратковременное открытие поры приведет к падению мембранного потенциала и рассеянию всех трансмембранных концентрационных градиентов: через поры будет происходить неспецифическое перераспределение ионов по градиентам (в частности, выход ионов  $Ca^{2+}$  и  $K^+$  и вход  $H^+$ ). Однако, так как целостность мембраны быстро восстанавливается вследствие самопроизвольного закрытия образовавшихся липидных пор (что является принципиальной особенностью этих пор), то мембранный потенциал будет восстанавливаться за счет работы дыхательной цепи. Реполяризация внутренней мембраны митохондрий, в свою очередь, повлечет за собой повторное поглощение органеллами вышедшего из митохондрий  $Ca^{2+}$ . Таким образом, закрытие поры приведет цикл к начальному состоянию: митохондрии начнут аккумулировать  $Ca^{2+}$  и цикл повторится [7].

Существование подобного  $Ca^{2+}$  цикла в митохондриях, когда вход иона осуществляется через  $Ca^{2+}$  уни-

портер, а выброс через липидную пальмитат/ $Ca^{2+}$ -индуцированную пору было продемонстрировано с добавленной пальмитиновой кислотой. Пальмитиновая кислота в присутствии  $Ca^{2+}$  вызывала падение мембранного потенциала и выброс  $Ca^{2+}$  из митохондрий. При этом предотвращение входа  $Ca^{2+}$  (рутием красным или лантаном) в митохондрии вызывало реполяризацию митохондриальной мембраны и остановку выброса из митохондрий  $Ca^{2+}$  вследствие невозможности образования новых пальмитат/ $Ca^{2+}$  комплексов и, соответственно, липидной поры [7, 36].

Вполне возможно, что активация подобной рециклизации  $Ca^{2+}$  через митохондриальную мембрану, когда вход  $Ca^{2+}$  опосредуется  $Ca^{2+}$  унипортером, а выброс иона происходит через открытые липидные поры, может являться для клетки как защитным, так и повреждающим механизмом. Так, было показано, что с возрастом происходит увеличение чувствительности митохондрий печени крыс к индукторам липидной поры — пальмитиновой кислоте и  $Ca^{2+}$  [7, 15]. Это увеличение чувствительности наряду с известным свойством пальмитиновой кислоты индуцировать апоптоз [45] может свидетельствовать о причастности липидной пальмитат-зависимой поры к механизмам внутриклеточного старения.

С другой стороны, было показано, что у животных, отличающихся по чувствительности к гипоксии, которая закрепленной генетически, индукция митохондриальной липидной поры происходит по-разному. Показано, что митохондрии печени высокоустойчивых к гипоксии животных более чувствительны к индукторам поры — пальмитиновой кислоте и  $Ca^{2+}$ , по сравнению с митохондриями, выделенными из печени низкоустойчивых животных. Можно предположить, что индукция поры, и активация циклизации  $Ca^{2+}$  через внутреннюю мембрану в случае с митохондриями высокоустойчивых животных будет приводить к слабому или

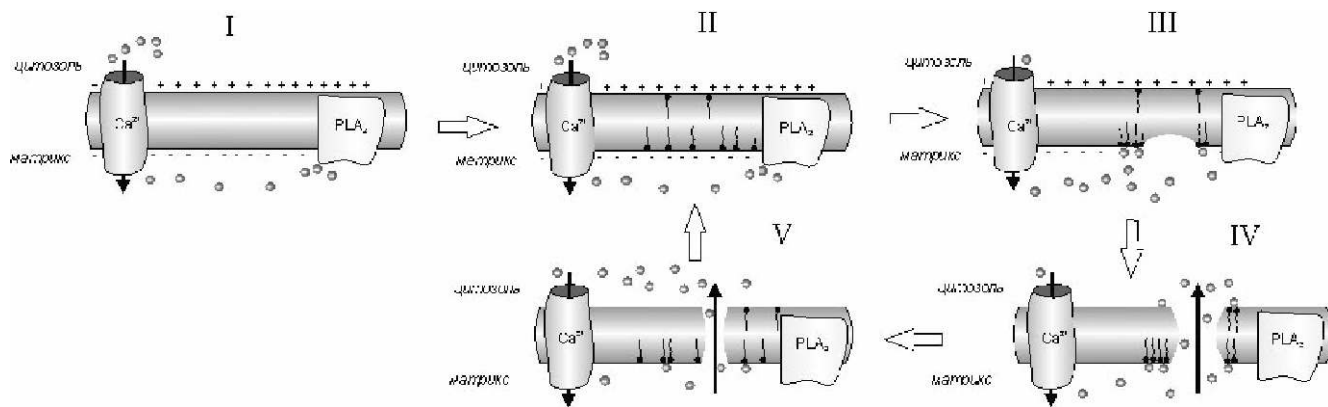


Рис. 4. Возможный механизм образования липидной пальмитат/ $Ca^{2+}$ -индуцированной поры в митохондриях при активации фосфолипазы  $A_2$ , объяснения в тексте

умеренному разобщению и таким образом предупреждению образования активных форм кислорода (АФК) при гипоксии. В то же время индукция поры в митохондриях низкоустойчивых к гипоксии животных будет способствовать повреждению митохондрий и запуску клеточной гибели. Это подтверждается экспериментами по образованию в этих состояниях АФК митохондриями. Показано, что индукция липидной поры в митохондриях высокоустойчивых животных снижала скорость образования активных форм кислорода, а в митохондриях низкоустойчивых к гипоксии животных скорость образования АФК при индукции поры увеличивалась [7, 15].

*Возможное участие митохондриальной липидной пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры в глутамат-индуцированной деградации нервных клеток*

С открытием в митохондриальной мембране липидной поры мы связываем также нарушения  $\text{Ca}^{2+}$  гомеостаза и функции митохондрий при продолжительной стимуляции нейронов центральной нервной системы глутаматом [29]. Механизм отсроченной  $\text{Ca}^{2+}$  дисрегуляции (ОКД) и мембранной деполяризации (МД) при перегрузке клеток глутаматом до сих пор не ясен. Не определены и факторы, предупреждающие ОКД и МД. Первоначально исследователи полагали, что ОКД и МД являются необратимыми процессами [20]. Однако было показано, что эти процессы могут быть обратимыми и их развитие, по крайней мере, на первых этапах, может подавляться блокаторами NMDA-каналов или хелатированием  $\text{Ca}^{2+}$  в инкубационной среде [29]. Увеличение ионной проводимости внутренней митохондриальной мембраны при развитии ОКД и МД трудно связать с открыванием МРТ поры, поскольку замена в инкубационной среде  $\text{Ca}^{2+}$  на  $\text{Sr}^{2+}$ , который, в отличие от  $\text{Ca}^{2+}$ , не способен открывать МРТ пору [17], а также присутствие ЦсА не препятствуют возникновению глутамат-индуцированного процесса деградации нервных клеток [18, 50]. Все эти факты побудили нас совместно с группой Б.И. Ходорова к поиску альтернативных механизмов  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой МД [10].

Было предположено, что увеличение в цитоплазме нервных клеток, а вслед за этим и в митохондриях свободного  $\text{Ca}^{2+}$  при глутаматной перегрузке, должно привести к активации фосфолипазы  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) и появлению жирных кислот, в том числе  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих, которые способствуют открытию липидной поры. Для проверки этого предположения на суспензии митохондрий мозга и печени крысы были выполнены исследования, имитирующие нагрузку митохондрий  $\text{Ca}^{2+}$ , в условиях предотвращающих возникновение циклоспорин А-чувствительной неспеци-

ческой мегапоры (МРТ). Эти исследования показали, что перегрузка митохондрий суррогатом кальция — стронцием приводит к выбросу из них  $\text{Sr}^{2+}$ , защелачиванию среды, снижению трансмембранного потенциала (рис. 5) и набуханию митохондрий [10]. Всё это свидетельствует о появлении неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий, обусловленной, вероятно, активацией фосфолипазы  $\text{A}_2$  ионами  $\text{Sr}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ ).

Подтверждение этого предположения получено в экспериментах с ингибиторами  $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ -зависимой  $\text{PLA}_2$ , которые подавляли перечисленные эффекты  $\text{Sr}^{2+}$  [10]. Установлено, что преинкубация митохондрий мозга с ингибитором  $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ -зависимой  $\text{PLA}_2$  арахидоноилтрифторметил кетоном (AACOCF<sub>3</sub>, 14 мкМ) приводит к снижению выброса ионов  $\text{Sr}^{2+}$  из митохондрий, ослаблению развития деполяризации мембраны и гораздо меньшему защелачиванию среды, наблюдаемых после последней добавки  $\text{Sr}^{2+}$  (рис. 5). Следовательно, AACOCF<sub>3</sub> предупреждал развитие

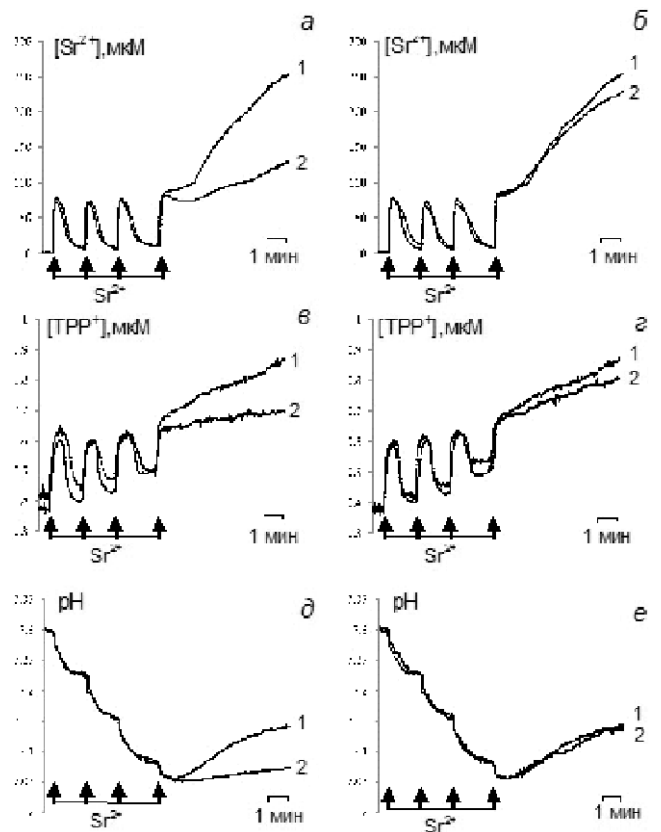


Рис. 5. Влияние ингибиторов  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой  $\text{PLA}_2$  — AAC(O)CF<sub>3</sub>, 14 мкМ (а, в, д) и  $\text{Ca}^{2+}$ -независимой  $\text{PLA}_2$  — PalC(O)CF<sub>3</sub>, 10 мкМ (б, г, е) на  $\text{Sr}^{2+}$ -индуцируемое циклоспорин А-нечувствительное открытие поры в митохондриях печени крысы: 1 — контроль; 2 — в присутствии ингибитора. Добавки:  $\text{Sr}^{2+}$  — 200 нмоль/мг белка (Миронова и др., 2011)

неспецифической проницаемости митохондрий. Подобные результаты были получены и с другими ингибиторами  $Ca^{2+}$ -зависимой фосфолипазы  $A_2$ , 4-(4-октадецилфенил) оксобутеновой кислотой (ОВАА), аристолоховой кислотой, трифторперазином как на митохондриях мозга, так и на митохондриях печени [10].

Следует отметить, что ингибиторы  $Ca^{2+}$ -независимой фосфолипазы  $A_2$  — броменол лактон (BEL) и пальмитилтрифторметил кетон (РАСОСF3), в отличие от ингибиторов  $Ca^{2+}$ -зависимой  $PLA_2$ , не предупреждали появления неспецифической проницаемости митохондриальной мембраны (рис. 5). В то же время, бычий сывороточный альбумин, который часто используют для связывания свободных жирных кислот, также предупреждал появление неспецифической проводимости мембраны.

Из полученных данных следует, что ионы  $Sr^{2+}$  вызывают активацию  $Ca^{2+}$ -зависимой фосфолипазы  $A_2$ , что приводит к появлению в митохондриальной мембране  $Ca^{2+}$ -связывающих жирных кислот, и как следствие, появлению неспецифической циклоспорин А-нечувствительной проницаемости митохондриальной мембраны.

Ингибиторы  $Ca^{2+}$ -зависимой  $PLA_2$  подавляли также глутамат-индуцированные изменения  $[Ca^{2+}]_i$  и  $\Delta\Psi_m$  в нервных клетках [10]. При добавлении глутамата (Glu) к культуре гранулярных нейронов мозжечка происходило небольшое скачкообразное увеличение  $[Ca^{2+}]_i$ , переходящее в умеренное плато (рис. 6). Продолжительное действие высоких концентраций Glu вызывало вторичное повышение  $[Ca^{2+}]_i$ . Предварительная инкубация культуры нейронов с ингибитором  $PLA_2$  арахидоилтрифторметил кетоном (AACOSF3, 10 мкМ) и последующее его присутствие во время действия Glu, отодвигали наступление ОКД. Аналогичным эффектом обладал и другой ингибитор  $PLA_2$  — ОВАА. Из графиков усредненных  $[Ca^{2+}]_i$  ответов на Glu видно, что увеличение латентного периода ОКД проявляется в уменьшении наклона графика изменений  $[Ca^{2+}]_i$  в присутствии AACOSF3 по сравнению с действием одного только Glu (рис. 6). Ингибиторы  $PLA_2$  подавляли также и глутамат-индуцированные изменения  $\Delta\Psi_m$  в культивированных нейронах мозжечка [10].

Исходя из имеющихся данных, мы полагаем, что начальная обратимая стадия ОКД и МД в нервных

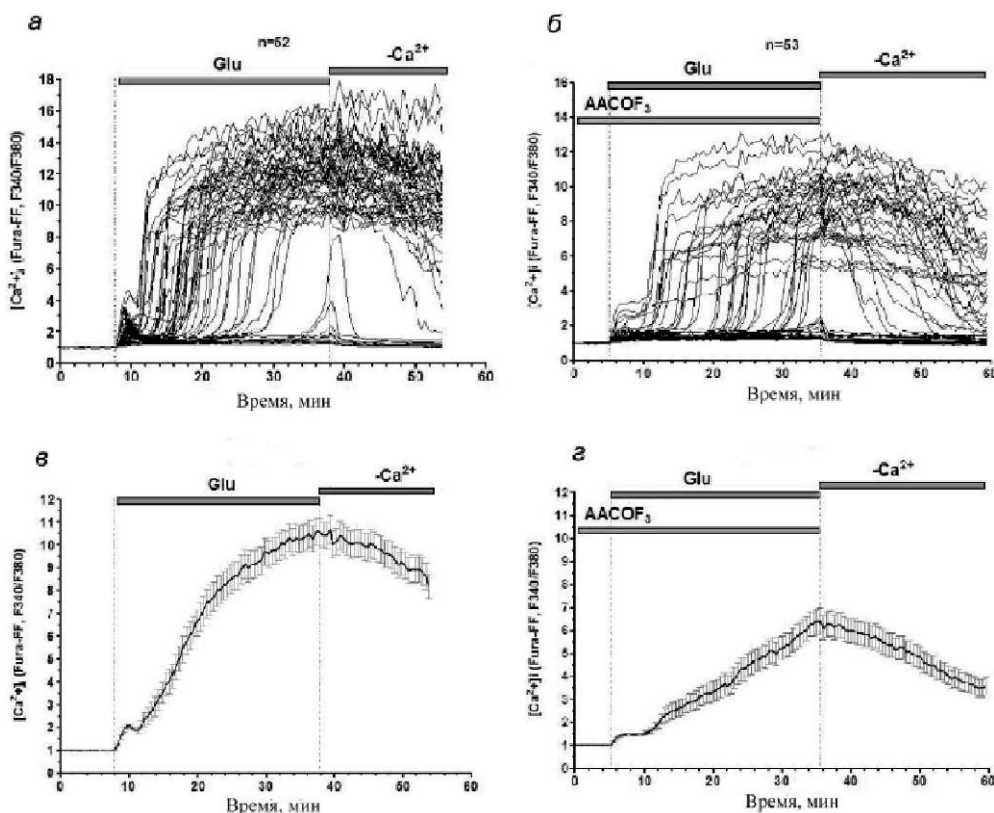


Рис. 6. Ингибирование фосфолипазы  $A_2$  увеличивает латентный период отсроченной кальциевой дисрегуляции в гранулярных нейронах мозжечка крысы. Графики изменения  $[Ca^{2+}]_i$  в индивидуальных нейронах (а, б) и усредненные изменения  $[Ca^{2+}]_i$  этих же нейронов (в, г), индуцированные одним глутаматом (Glu, 100 мкМ) (а, в) и Glu в присутствии ингибитора фосфолипазы  $A_2$  арахидоилтрифторметил кетона (10 мкМ AACOSF3) (б, г). (Миронова и др., 2011)

клетках при их перегрузке глутаматом, может быть обусловлена открытием в митохондриях липидной пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры.

Как известно, при продолжительной стимуляции NMDA рецепторов глутаматом наблюдается поступление в клетку избыточного количества  $\text{Ca}^{2+}$ . Это, в свою очередь, приведет к появлению в матриксе митохондрий свободного  $\text{Ca}^{2+}$ , что сопровождается активацией  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой  $\text{PLA}_2$  и накоплением в матриксе митохондрий жирных кислот. Как уже отмечалось выше, несмотря на то, что ненасыщенная арахидоновая кислота является основным продуктом действия фосфолипазы  $\text{A}_2$ , при активации фосфолипазы  $\text{A}_2$  наблюдается также увеличение свободных насыщенных жирных кислот. Насыщенные жирные кислоты, и в первую очередь пальмитиновая, будут формировать во внутренней мембране митохондрий  $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ -зависимые короткоживущие поры, способствующие выбросу иона из митохондрий, падению  $\Delta\Psi$  и рН-градиента между матриксом и внешним окружением митохондрий, а также набуханию митохондрий [35, 46].

Следует заметить, что арахидоновая кислота не способна вызывать открытие короткоживущей липидной поры [47]. Тем не менее, нельзя исключить дополнительного эффекта арахидоновой кислоты в развитии ОКД, особенно на её необратимой стадии.

Как было сказано выше, развитие глутамат-индуцированной ОКД и МД в конечном счете приведет к гибели клетки. Причиной этого может быть выброс проапоптотических белков (цитохром с, апоптоз-индуцирующий фактор (АИФ), Smac/Diablo) из митохондрий, которые запускают каскад апоптотических ферментов [21, 22, 29].

Известно, что пальмитиновая кислота является природным индуктором апоптоза. Её добавление к культуре клеток приводит к выбросу в цитоплазму митохондриальных проапоптотических белков [20], который может быть осуществлен при открытии в митохондриях липидной пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированной поры. Было показано, что при открытии этой поры происходит выход из органелл цитохрома с и АИФ [4, 5, 7, 15, 15]. Вполне вероятно, что открытие липидной поры в митохондриях нейронов при глутамат-индуцированной  $\text{Ca}^{2+}$  дисрегуляции будет приводить к включению апоптотических сигналов и развитию пальмитат-индуцированного апоптоза. Участие митохондриальной липидной пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированной поры в пальмитат-индуцированном апоптозе выглядит привлекательным еще и потому, что, как уже обсуждалось выше, липидная пора является короткоживущей [35, 46], т.е. способна закрываться, и таким образом практически не нарушается основная митохондриальная функция — синтез АТФ, что необходимо для развития апоптоза.

На основании данных, полученных на выделенных митохондриях и первичной культуре гранулярных клеток мозжечка крысы, мы полагаем, что ОКД и МД, развивающиеся в нейронах при длительном действии глутамата, могут быть обусловлены открытием в митохондриальной мембране пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$  активируемой поры, по крайней мере в начальной фазе развития ОКД. На следующих стадиях это может вызвать развитие апоптоза и некроза в нервных клетках.

*Работа поддержана грантами РФФИ (09-04-01024-а, 10-04-00920-а, 12-04-00430-а), ДПННУТ (4.3010.2011) и грантом президента Российской Федерации для молодых кандидатов наук (МК-145.2012.4).*

### Список литературы

1. Антонов В.Ф., Смирнова Е.Ю., Шевченко Е.В. Липидные мембраны при фазовых превращениях. — М.: Наука, 1992.
2. Антонов В.Ф., Шевченко Е.В. Липидные поры и стабильность клеточных мембран // Вестн. РАМН. — 1995. — 10. — С. 48—55.
3. Белослудцев К.Н., Белослудцева Н.В., Миронова Г.Д. Возможный механизм образования и регуляции пальмитат-индуцированной циклоспорин А-нечувствительной митохондриальной поры // Биохимия. — 2005. — 70. — С. 987—994.
4. Белослудцев К.Н., Белослудцева Н.В., Миронова Г.Д. Роль митохондриальной пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -активируемой поры в пальмитат-индуцируемом апоптозе // Биофизика. — 2008. — 6. — С. 6—11.
5. Белослудцев К.Н., Миронова Г.Д. Митохондриальная пальмитат/кальций-индуцированная пора: свойства и возможная роль в активации апоптоза. — LAP Lambert academic publishing, Saarbrücken, 2011.
6. Белослудцева Н.В., Белослудцев К.Н., Агафонов А.В., Миронова Г.Д. Влияние холестерина на образование в митохондриях и липосомах пальмитат/ $\text{Ca}^{2+}$ -активируемой поры // Биофизика. — 2009. — 54(3). — С. 464—470.
7. Белослудцева Н.В., Миронова Г.Д. Митохондриальная липидная пора, индуцированная пальмитатом и кальцием: свойства и физиологические аспекты функционирования. — LAP Lambert academic publishing, Saarbrücken, 2011.
8. Гриценко Е.Н., Миронова Г.Д. Пермеабиллизация мембран при связывании кальция с жирными кислотами: физико-химический механизм и возможность его реализации в митохондриальной мембране. — LAP Lambert academic publishing, Saarbrücken, 2011.
9. Лейкин С.Л., Глазер Р.В., Черномордик Л.В. Механизм образования пор при электрическом пробое мембран // Биологические мембраны. — 1986. — С. 944—951.
10. Миронова Г.Д., Белослудцев К.Н., Сурин А.М. и др. Митохондриальная липидная пора в механизме глутамат-индуцируемой кальциевой дисрегуляции нейронов мозга // Биологические мембраны. — 2011. — 28(6). — С. 483—494.

11. **Чизмаджев Ю.А., Черномордик Л.В., Пастушенко В.Ф., Абидор И.Г.** Электрический пробой бислойных липидных мембран // ВИНТИ. — 1982. — С. 161–266.
12. **Agafonov A., Gritsenko E., Belosludtsev K.** et al. A permeability transition in liposomes induced by the formation of  $\text{Ca}^{2+}$ /palmitic acid complexes // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2003. — 1609, 2. — P. 153–160.
13. **Agafonov A.V., Gritsenko E.N., Shlyapnikova E.N.** et al.  $\text{Ca}^{2+}$ -induced phase separation in the membrane of palmitate-containing liposomes and its possible relation to membrane permeabilization // *J. Membr. Biol.* — 2007. — 215 (1). — P. 57–68.
14. **Belosludtsev K.N., Saris N.-E.L., Andersson L.C.** et al. On the mechanism of palmitic acid-induced apoptosis: the role of a pore induced by palmitic acid and  $\text{Ca}^{2+}$  in mitochondria // *J. Bioenerg. Biomembr.* — 2006. — 38. — P. 113–120.
15. **Belosludtsev K.N., Saris N.E., Belosludtseva N.V.** et al. Physiological aspects of the mitochondrial cyclosporin A-insensitive palmitate/ $\text{Ca}^{2+}$ -induced pore: tissue specificity, age profile and dependence on the animal's adaptation to hypoxia // *J. Bioenerg. Biomembr.* — 2009. — 41. — P. 395–401.
16. **Belosludtsev K.N., Trudovishnikov A.S., Belosludtseva N.V.** et al. Palmitic acid induces the opening of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pore in the plasma membrane of red blood cells: the possible role of the pore in erythrocyte lysis // *J. Membr. Biol.* — 2010. — 237(1). — P. 9–13.
17. **Bernardi P.** Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition // *Physiol. Rev.* — 1999. — 79. — P. 1127–1155.
18. **Bolshakov A.P., Mikhaylova M.M., Szabadkai G.** et al. Measurements of mitochondrial pH in cultured cortical neurons clarify contribution of mitochondrial pore to the mechanism of glutamate-induced delayed  $\text{Ca}^{2+}$  deregulation // *Cell Calcium.* — 2008. — 43. — P. 602–614.
19. **Bodrova M., Dedukhova V., Samartsev V., Mokhova E.** Role of the ADP/ATP antiporter in fatty acid-induced uncoupling of  $\text{Ca}^{2+}$ -loaded rat liver mitochondria // *IUBMB Life.* — 2000. — 50. — P. 189–194.
20. **Budd S.L., Nicholls D.G.** Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells // *J. Neurochem.* — 1996. — 67. — P. 2282–2291.
21. **Choi D.W., Rothman S.M.** The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death // *Annu. Rev. Neurosci.* — 1990. — 13. — P. 171–182.
22. **Crompton M.** Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death // *J. Physiol.* — 2000. — 529. — P. 11–21.
23. **De Carvalho M.G.S., Garritano J., Leslie C.C.** Regulation of lysophospholipase activity of the 85-kDa phospholipase  $\text{A}_2$  and activation in mouse peritoneal macrophages // *J. Biol. Chem.* — 1995. — 270. — P. 20439–20446.
24. **Duchen M.R.** Mitochondria and  $\text{Ca}^{2+}$  in cell physiology and pathophysiology // *Cell Calcium.* — 2000. — 28. — P. 339–348.
25. **Fleck M.W., Henze D.A., Barrionuevo G., Palmer A.M.** Aspartate and glutamate mediate synaptic transmission in area C1A of the hippocampus // *J. Neurosci.* — 1993. — 13(9). — P. 3944–3955.
26. **Gadd M.E., Broekemeier K.M., Crouser E.D.** et al. Mitochondrial iPLA $_2$  activity modulates the release of cytochrome c from mitochondria and influences the permeability transition // *J. Biol. Chem.* — 2006. — 281(11). — P. 6931–6939.
27. **Gateau-Roesch O., Pavlov E., Lazareva A.V.** et al. Calcium-binding properties of the mitochondrial channel-forming hydrophobic component // *J. Bioenerg. Biomembr.* — 2000. — 32. — P. 105–110.
28. **Jacobson K., Papahadjopoulos D.** Phase transitions and phase separations in phospholipid membranes induced by changes in temperature, pH, and concentration of bivalent cations // *Biochemistry.* — 1975. — 14. — P. 152–161.
29. **Khodorov B.** Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurons // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* — 2004. — 86 (2). — P. 279–351.
30. **Lemasters J.J., Nieminen A.L., Qian T.** et al. The mitochondrial permeability transition in toxic, hypoxic and reperfusion injury // *Mol. Cell. Biochem.* — 1997. — 174. — P. 159–165.
31. **Liu X., Kim C., Yang J.** et al. Induction of apoptosis program in cell-free extracts: requirement for ATP and cytochrome c // *Cell.* — 1996. — 86. — P. 147–157.
32. **Loo R.W., Conde-Frieboes K., Reynolds L.J., Dennis E.A.** Activation, inhibition and regiospecificity of the lysophospholipase activity of the 85-kDa group IV cytosolic phospholipase  $\text{A}_2$  // *J. Biol. Chem.* — 1997. — 272. — P. 19214–19219.
33. **Mironova G.D., Lazareva A., Gateau-Roesch O.** et al. Oscillating  $\text{Ca}^{2+}$ -induced channel activity obtained in BLM with a mitochondrial membrane component // *J. Bioenerg. Biomembr.* — 1997. — 29, 6. — P. 561–569.
34. **Mironova G.D., Gateau-Roesch O., Levrat C.** et al. Palmitic and stearic acids bind  $\text{Ca}^{2+}$  with high affinity and form nonspecific channels in black-lipid membranes. Possible relation to  $\text{Ca}^{2+}$ -activated mitochondrial pores // *J. Bioenerg. Biomembr.* — 2001. — 33. — P. 319–331.
35. **Mironova G.D., Gritsenko E., Gateau-Roesch O.** et al. Formation of Palmitic Acid/ $\text{Ca}^{2+}$  Complexes in the Mitochondrial Membrane: A Possible Role in the Cyclosporin-Insensitive Permeability Transition // *J. Bioenerg. Biomembr.* — 2004. — 36. — P. 171–178.
36. **Mironova G.D., Belosludtsev K.N., Belosludtseva N.V.** et al. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  cycle mediated by the palmitate-activated cyclosporin A-insensitive pore // *J. Bioenerg. Biomembr.* — 2007. — 39. — P. 167–174.
37. **Nicholls D.G., Budd S.L.** Mitochondria and neuronal survival // *Physiol. Rev.* — 2000. — 80 (1). — P. 315–360.
38. **Olney J.W.** Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate // *Science.* — 1969. — 1646. — P. 719–721.
39. **Pilitis J.G., Diaz F.G., O'Regan M.H., Phillis J.W.** Differential effects of phospholipase inhibitors on free fatty acid efflux in rat cerebral cortex during ischemia-reperfusion injury // *Brain Res.* — 2002. — 951. — P. 96–106.
40. **Pinelis V.G., Tuhbatova G., Surin A.** et al. Society for Neuroscience 38<sup>th</sup> Annual Meeting. — Chicago, IL, October 17–21, 2009. — P. 212.
41. **Rand R.P.** Mechanical Properties of the Red Cell Membrane. II. Viscoelastic Breakdown of the Membrane // *Biophys. J.* — 1964. — 17. — P. 303–316.
42. **Rizzuto R., Brini M., Murgia M., Pozzan T.** Microdomains with high  $\text{Ca}^{2+}$  concentration that are sensed by neighboring mitochondria // *Science.* — 1993. — 262. — P. 744–747.
43. **Saris N.-E.L.** Stimulation of phospholipase  $\text{A}_2$  activity in mitochondria by magnesium and polyamines // *Magnesium Res.* — 1994. — 7. — P. 5–10.
44. **Schmidt G., Knoll W.** Densitometric characterization of aqueous lipid dispersions // *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* — 1985. — 89. — P. 36–43.
45. **Sparagna G., Hickson-Bick D., Buja L., McMillin J.** A metabolic role for mitochondria in palmitate-induced cardiac myocyte apoptosis // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2000. — 279. — P. 2124–2132.

---

46. **Sultan A., Sokolove P.** Palmitic acid opens a novel cyclosporin A-insensitive pore in the inner mitochondrial membrane // Arch. Biochem. Biophys. — 2001a. — 386. — P. 31–51.

47. **Sultan A., Sokolove P.** Free fatty acid effects on mitochondrial permeability: an overview // Arch. Biochem. Biophys. — 2001b. — 386. — P. 52–61.

48. **Thorne T.E., Voelkel-Johnson C., Casey W.M.** et al. The activity of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> is required for the lysis of adenovirus-infected cells by tumor necrosis factor // J. Virology. — 1996. — 70. — P. 8502–8507.

49. **Vergun O., Reynolds I.J.** Fluctuations in mitochondrial membrane potential in single isolated brain mitochondria: modulation by adenine nucleotides and Ca<sup>2+</sup> // Biophys. J. — 2004. — 87 (5). — P. 3585–3593.

50. **Wabnitz A.V., Storozhevyykh T.P., Selinova Y.E.** et al. The permeability pore is not a prerequisite for Glutamate-induced calcium deregulation and mitochondrial depolarization in brain neurons // Biol. Membr. (Russian). — 2005. — 22 (4). — P. 347–350.

51. **Wieckowski M., Wojtczak L.** Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore // FEBS Lett. — 1998. — 423. — P. 339–342.

52. **Zoratti M., Szabo I.** Mitochondrial permeability transition // Biochim. Biophys. Acta. — 1995. — 1241. — P. 139–176.

53. **Zoratti M., Szabo I., De Marchi U.** Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house? // Biochim. Biophys. Acta. — 2005. — 1706. — P. 40–52.

Поступила 21.03.12

#### Сведения об авторах:

Миронова Галина Дмитриевна, д-р биол. наук, проф., засл. деят. науки РФ, зав. лаб. митохондриального транспорта ФГУН ИТЭБ РАН, проф. ФГБОУ ВПО «ПущГЕНИ»



Ю.С. Медникова<sup>1</sup>, С.Н. Кожечкин<sup>2</sup>, Ф.В. Копытова<sup>3</sup>, О.Х. Коштоянц<sup>1</sup>

## Приспособительная функция мозга и проблемы гипоксии

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии» Российской академии наук, Москва, 117485, ул. Бултерова, 5а

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова» Российской академии медицинских наук, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр неврологии» Российской академии медицинских наук, Москва, 105064, пер.Обуха, 5

На основе литературных и собственных данных делается вывод о том, что приспособительное поведение обеспечивается за счет изменения спонтанной активности нейронов. Спонтанная активность регулируется метаболической М-холинергической реакцией мозга по механизму увеличения эффективности проводящей функции дендритов в результате блокады  $K^+$  проницаемости нейрональных мембран. Высокие энергетические потребности холинергического процесса создают угрозу для выживания нервных клеток в условиях гипоксии.

**Ключевые слова:** нейроны коры, спонтанная активность, ацетилхолин, температура, гипоксия

Yu.S. Mednikova<sup>1</sup>, S.N. Koghechkin<sup>2</sup>, F.V. Kopytova<sup>3</sup>, O.Kh. Koshtojantz<sup>1</sup>

## Adaptive function of the brain and problems of hypoxia

<sup>1</sup> Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, 5A, Butlerov street, Moscow, 117485, Russia

<sup>2</sup> Institute of Pharmacology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

<sup>3</sup> Research Center of Neurology RAMS, 5, Obukha lane, Moscow, 105064, Russia

Based on the findings of various authors and own experimental data it was concluded that adaptive behaviour is regulated by changing in the level of spontaneous neuronal activity. Spontaneous firing is monitored by brain metabolic M-cholinergic reaction which increased the efficacy of dendritic propagation by mechanism of  $K^+$  membrane channels blockade. High energy demands of cholinergic process creates a threat to nerve cells survival in hypoxic conditions.

**Key words:** cortical neurons, spontaneous activity, acetylcholine, temperature, hypoxia

Энергетические потребности мозга теплокровных являются предметом пристального внимания исследователей. Мозг, масса которого составляет всего 2% от массы тела, потребляет около 20% всех энергоресурсов, вырабатываемых в организме. Естественно предположить, что причиной таких высоких энергетических потребностей является специфическая функция центральной нервной системы по обеспечению приспособительного поведения. Эта точка зрения базируется на многочисленных экспериментальных данных, показывающих, что активное состояние мозга, связанное с сенсорным восприятием, безусловнорефлекторной деятельностью, с приобретением или выполнением поведенческих навыков, требует повышенного уровня энергетического метаболизма в разных областях мозга [16, 19, 23, 33]. При этом нейроны, непосредственные регуляторы самых разнообразных адаптивных реакций, потребляют энергии в 12 раз больше, чем ткань мозга,

в целом [4]. Существует несколько предположений относительно наиболее энергоемких процессов, протекающих в нейронах [26]. Если поддержание стабильного значения потенциала покоя требует минимальных энергетических затрат, к тому же одинаковых у нервных и глиальных клеток, то спайковая активность, сопряженная с энергетически зависимыми процессами, такими, как обратное поглощение выделенного при активации глутамата, экзо- и эндоцитоз везикул из пресинаптических окончаний, трансмембранный перенос ионов  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{++}$ , постоянно сопровождающий каждый цикл активации, — рассматриваются как основные потребители энергии в нервной ткани [26]. Вместе с тем, элементарный процесс формирования спайка и условия его возникновения являются идентичными в мозге теплокровных и хладнокровных позвоночных [12]. Импульсная активность нейронов хладнокровных в среднем несколько выше, чем у млекопитающих — у рыб, например, полностью отсутствуют нейроны со спонтанной частотой разрядов до 1 имп./с [14]. Однако, энергетические потребности мозга хладнокровных примерно в 5 раз ниже, чем у теплокровных [4]. Следовательно, средний уровень

Для корреспонденции: Медникова Юлия Сергеевна, д-р биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. нейрохимических механизмов обучения и памяти ФГБУН «ИВНД и НФ» РАН.  
E-mail: zubkov@mi.ras.ru

импульсации не может быть критерием энергетической зависимости нервной деятельности и нужно искать другие показатели.

Чтобы установить связь между энергетикой и особенностями функционирования мозга мы провели комплексное исследование в разных экспериментальных ситуациях: на бодрствующих животных и на переживающих срезах мозга. В обоих случаях исследованию подвергались нейроны сенсомоторной коры.

### *Регулирование*

#### *уровня спонтанной активности как механизм формирования приспособительного поведения*

В классической работе E.V. Evarts [17] при выработке у обезьян максимально коротколатентной условной реакции разгибания передней конечности на сигнальный стимул в прецентральных нейронах коры были обнаружены спайковые ответы с разной величиной приращения над фоновым уровнем, в том числе и очень высокой (более 40 имп./с). Все зарегистрированные нейроны отвечали с латентными периодами более 200 мс, а увеличение импульсации длилось до нескольких секунд, в конечном итоге запуская моторную условнорефлекторную реакцию. Длительный латентный период условных реакций, намного превышавший время прихода в кору специфического возбуждения, а также продолжительное течение импульсных ответов свидетельствовали об их неспецифической природе [17]. Сходная динамика реагирования нейронов в ответ на подготовительный сигнал была обнаружена во многих последующих экспериментах по изучению механизмов формирования условных приспособительных двигательных реакций [21, 27]: нейронная активность начинала изменяться не раньше чем через 200 мс после стимула, среднее время двигательных реакций составило 300 мс и более. При выработке условной оборонительной реакции, которая должна была предотвратить электрокожное раздражение конечности, условный двигательный ответ становился возможным только после того, как спонтанная импульсная активность нейронов сенсомоторной коры пятикратно возросла по мере предъявления сочетаний звукового и электрокожного раздражителей [6]. Аналогичные результаты были получены в работе [10], где было к тому же показано, что показатели спонтанной активности нейронов гиппокампа изменяются примерно в 3 раза в ситуации, когда сигнальное значение условного звукового раздражителя меняется с пищевого на оборонительный. Приведенные примеры формирования нейрональных ответов, запускающих соответствующее приспособительное поведение, свидетельствуют о том, что при выполнении своей основной функции мозг регулирует импульсную активность, используя неспецифические механизмы.

Мы изучали характер реагирования нейронов моторной области коры при выполнении животным простейшей приспособительной реакции — реакции разгибания передней конечности на пороговое электрокожное раздражение.

### **Методика**

Эксперименты проведены на бодрствующих необездвиженных кроликах, жестко фиксированных в станке. Движения головы ограничивались специальным головодержателем-узечкой, не оказывающим травмирующего действия на животное. В зоне моторного представительства передней конечности экстраклеточно регистрировали активность отдельных нервных клеток. Область регистрации (AP0; L2) определяли в начале эксперимента по возникновению легкой реакции разгибания запястья передней лапы в ответ на эпидуральную стимуляцию коры. Неподвижную часть микроманипулятора крепили фосфат-цементом над областью коры с наименьшим порогом возникновения двигательной реакции. Для регистрации активности нейронов использовали стеклянные микроэлектроды, заполненные 3М раствором NaCl (сопротивление 2—4 МОм). Одновременно с регистрацией импульсной активности нейронов проводили запись электромиографической (ЭМГ) активности мышц-разгибателей запястья. ЭМГ регистрировали подкожными прошивными электродами.

В качестве афферентных стимулов использовали электрокожное раздражение (ЭКР) передней конечности (серия из 5 прямоугольных импульсов тока силой 1,5—4,8 мА с частотой следования 10/с и длительностью импульса 100 мкс). Раздражение наносилось на конечность, контралатеральную стороне регистрации импульсной активности в коре мозга. Силу тока подбирали минимальной для возникновения ЭМГ-ответа раздражаемой конечности.

В период регистрации отдельного нейрона подавали серию электрокожных стимулов, содержавших, если позволяли условия регистрации, от 20 до 50 предъявлений ЭКР. Большое число подаваемых однотипных раздражителей давало материал для построения усредненных перистимульных гистограмм, в каждом бине которых накапливалось большое число спайков, что позволяло с помощью специальной компьютерной программы строить эмпирические функции распределения межспайковых интервалов на коротких (200 мс) временных стадиях, соответствующих этапам развития вызванного активационного ответа. Анализировали также латентные периоды возникающих импульсных реакций и их продолжительность.

## Результаты и обсуждение

Среди нейронов, зарегистрированных в сенсомоторной коре бодрствующих кроликов, 36 нервных клеток в ответ на электрокожное раздражение формировали реакции в виде повышения импульсной активности. На рис. 1 показан пример активационной реакции на ЭКР у одного из зарегистрированных нейронов. Импульсная активность нейрона представлена в виде перистимульной гистограммы (нижний фрагмент рис. 1А), построенной при усреднении 21 реакции. Хорошо видно, что ответ состоит из коротколатентного высокочастотного компонента, который плавно переходит в период тонического повышения импульсации, значительно превышающий по длительности (8 с) время действия реального раздражителя (0,5 с). На рис. 1Б показано, что длительность ЭМГ-ответа на электрокожное раздражение определяется суммарной продолжительностью обоих компонентов импульсной реакции нейрона. На верхнем фрагменте рис. 1А в графическом виде представлены распределения межспайковых интервалов в каждом последовательном 200 мс бине гистограммы. Формы этих распределений отчетливо демонстрируют, что первый — специфический компонент реакции значительно отличается от второго — неспецифического по характеру распределения межспайковых интервалов и, следовательно, оба компонента имеют разное происхождение. Из 36 нейронов, отвечавших активацией на ЭКР, только у 9 нервных клеток были обнаружены коротколатентные (до 30 с) реакции, тогда как у большинства нейронов ( $n=27$ ) ответы состояли только из длиннорлатентных (более 100 мс) неспецифических продолжительных реакций, как это показано на рис. 2. Следовательно, неспецифический тип реагирования является доминирующим при формировании активационных реакций на сенсорный раздражитель. Мощность этих неспецифических реакций обеспечивает приращение импульсации над уровнем фона на 5—10 имп./с и более. Все это свидетельствует о том, что характер двигательного ответа на ЭКР практически полностью определяется суммарной неспецифической реакцией нейронов сенсомоторной коры (рис. 2). Таким образом, формирование безусловнорефлекторных ответов, так же как и условнорефлекторных [6, 10, 17, 21, 27], зависит от развертывания неспецифических процессов, повышающих уровень спонтанной активности нейронов.

*М-холинергическая реакция мозга, ее температурная зависимость и роль в формировании гипоксических состояний*

В экспериментах, проведенных на срезах сенсомоторной коры морских свинок, удалось показать, что уровень спонтанной активности нейронов непосредственно зависит от условий проведения возбуждения из дендритов в сому [7]. В переживающих срезах коры

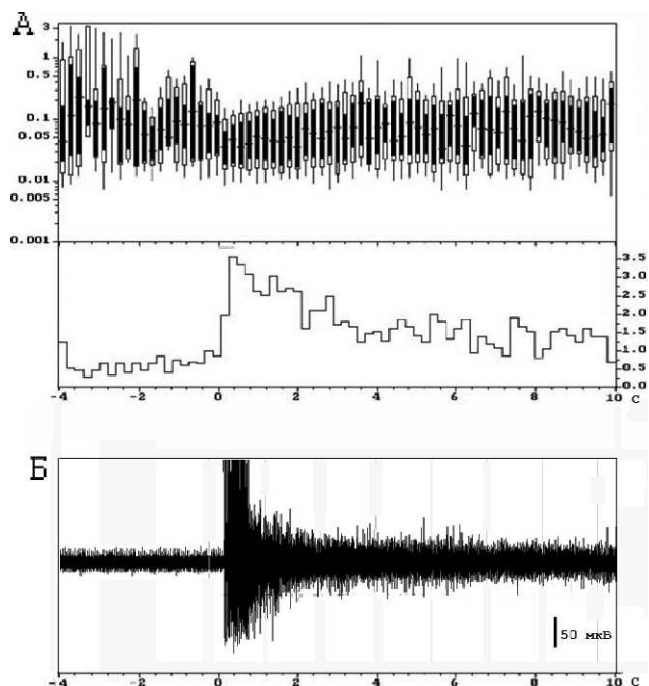


Рис. 1. Двухкомпонентный ответ нейрона сенсомоторной коры на электрокожное раздражение передней конечности и ЭМГ реакция животного: А — на нижней части изображена перистимульная гистограмма среднего числа спайков (из 21 предъявления) за 200 мс, черта сверху соответствует времени действия раздражителя. Цифры по вертикальную ось справа обозначают число спайков за 200 мс. В верхней части рисунка прямоугольниками изображены квантили эмпирических функций распределения межспайковых интервалов в последовательных 0,2 с периодах, соответствующих бинам гистограммы. Центральная линия в прямоугольнике соответствует квантили 50%, края закрашенного прямоугольника — квантилям 25 и 75%, края контурного прямоугольника — квантилям 15 и 85%, концы отрезков — квантилям 5 и 95%. По вертикали в логарифмической шкале отложены величины встречающихся интервалов (с); Б — электромиографический ответ на электрокожное раздражение мышц-разгибателей запястья передней конечности

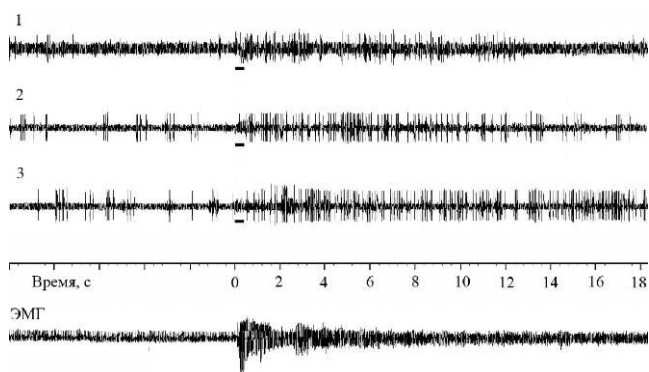


Рис. 2. Примеры импульсных реакций на электрокожную стимуляцию трех разных нейронов сенсомоторной коры: 1, 2, 3 — осциллограммы активности трех разных нейронов на ЭКР передней конечности. Длительность действия раздражителя отмечена черным прямоугольником под каждой осциллограммой. Шкала времени — в секундах, 0 соответствует началу стимуляции. Пример электромиографического ответа на ЭКР представлен на нижней осциллограмме

около 40% нейронов не имеют фоновой импульсации [7, 8]. У некоторых нейронов фоновая активность может возникнуть без каких-либо видимых причин. С помощью специально разработанной методики, позволяющей локально подводить медиаторы к отдельным пунктам на мембране нейронов, удалось обнаружить, что появлению и последующему росту уровня спонтанной активности предшествует постепенное увеличение интенсивности импульсных реакций нервных клеток на ионофоретическое подведение глутамата к отдельным дендритным локусам [7, 8]. Проведение возбуждения по дендритам осуществляется со значительным декрементом, величина которого пропорциональна электротонической протяженности дендрита [32]. Амплитуда ВПСП в тонких дендрит-

ных веточках из-за их большого входного сопротивления может составить до 50 мВ [29]. Следовательно, чтобы возникла стабильная фоновая активность, формируемая за счет постоянного протекания по дендритам потока миниатюрных ВПСП [34], требуется снизить декремент проведения. Эту функцию в нервной системе осуществляет метаболическая М-холинергическая реакция за счет блокады  $K^+$  проницаемости нейрональных мембран [25, 30] одновременно по всей поверхности нейрона вне зависимости от пункта приложения ацетилхолина [18, 31]. В результате снижается ток утечки по пути следования возбуждения из дендритов и значительно (в несколько раз) увеличивается амплитуда ВПСП при очень небольшом (несколько процентов) увеличении удельного сопротивления мембран [11]. Это и приводит к появлению и росту фоновой активности нейронов [8]. Дополнительное выделение ацетилхолина из холинергических депо мозга является обязательной реакцией нервной системы на любое сенсорное возбуждение [13, 22]. Реакция на ацетилхолин, таким образом, формирует неспецифический компонент ответа на раздражитель, причем тем более выраженный, чем выше сигнальное значение стимула [9, 13].

М-холинергическая реакция, будучи метаболическим процессом [3, 15, 24], требует относительно большого времени для развития необходимых биохимических преобразований, приводящих к блокаде  $K^+$  каналов. Поэтому латентный период этой реакции составляет 200—250 мс при температуре 34—35°C [15, 30]. Именно такую продолжительность имеет латентный период неспецифического повышения импульсации в ответ на сенсорный раздражитель [17, 21, 27]. На рис. 3Б представлены примеры реагирования на ацетилхолин нейронов V слоя сенсомоторной коры в переживающих срезах мозга. Очевидно, что характер течения импульсной активности, вызванного ионофоретической аппликацией ацетилхолина к клеточным телам, полностью совпадает с неспецифическим компонентом ответа на ЭКР нейронов бодрствующих кроликов (рис. 1 и 2). Метаболическая природа холинергической реакции может быть причиной ее высокой температурной зависимости.

## Методика

Термобиологические эксперименты были проведены на срезах сенсомоторной коры морских свинок. Срезы толщиной 500 мкм приготавливали из продольного блока коры с помощью вибротома VSL (World Precision Instruments, США). Инкубационная камера, в которую помещали срезы, состояла из двух отсеков с независимым протоком раствора Рингера — Кребса, насыщенного газовой смесью (95%  $O_2$  + 5%  $CO_2$ ) и

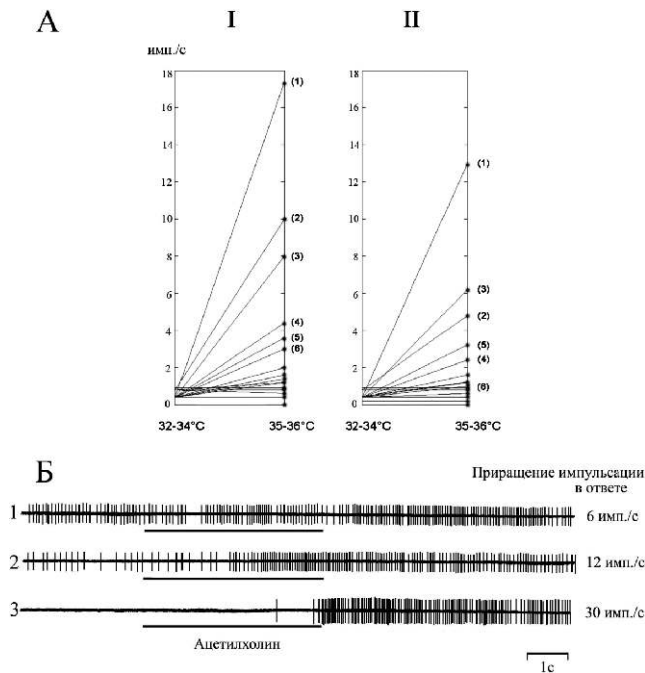


Рис. 3. Температурная зависимость скорости М-холинергической реакции и примеры импульсных ответов на аппликацию ацетилхолина у нейронов с разным уровнем спонтанной активности:

А — диаграммы на I и II изображают изменения частоты импульсной активности каждого из 16 спонтанно неактивных при  $t=32-34^\circ C$  нейронов на микроионофоретическое подведение ацетилхолина (I) и в предшествующий период спонтанной активности (II) при увеличении температуры от 32—34 до 35—36°C. Номера шести нейронов, обнаруживших наиболее значительные изменения импульсации при температурном переходе, отмечены в скобках возле соответствующих прямых. По горизонтали — два температурных диапазона 32—34 и 35—36°C, по вертикали — максимальная текущая средняя частота импульсной активности; Б — микроионофоретическая аппликация ацетилхолина производилась к соме нейронов при температуре инкубационной среды 34—35°C. Ток фореза ацетилхолина всюду 80 нА (положительный полюс внутри электрода). 1, 2 — реакции двух спонтанно активных нейронов; 3 — пример реагирования одного из спонтанно неактивных нейронов. Длительность фореза отмечена чертой под каждой осциллограммой. Цифры справа указывают величину приращения импульсации в ответ на ацетилхолин по сравнению с уровнем предшествующего фона

состоявшего из (мМ): 124 — NaCl; 2,4 — CaCl<sub>2</sub>; 1,3 — MgSO<sub>4</sub>; 5 — KCl; 1,25 — KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 26 — NaHCO<sub>3</sub> и 10 — глюкозы. Приготовленные срезы в течение 1 ч инкубировали при комнатной температуре, затем температуру раствора повышали до 32—34°C. Этот уровень поддерживали в качестве стандартного в течение всего эксперимента. Повышение температуры осуществляли до уровня 36—38°C со скоростью 2°/мин. С такой же скоростью температура восстанавливалась.

Для экстраклеточной регистрации импульсной активности и ионофоретического подведения медиаторов использовали 3-канальные стеклянные микроэлектроды, с общим диаметром кончика 7,4—8 мкм. Отводящий канал в электродах заполняли 3М раствором NaCl. Второй канал содержал 2М раствор ацетилхолинхлорида, третий канал заполняли 1М раствором глутамата натрия («Sigma» США) для тестирования импульсной активности в случае регистрации малоактивных и молчащих нейронов. Ток фореза ацетилхолина составлял 40—60 нА (положительный полюс внутри электрода). Глутамат подводили током 15—30 нА (отрицательный полюс внутри электрода).

### Результаты и обсуждение

Эксперименты проведены на 30 нейронах сенсомоторной коры. Зарегистрированные нервные клетки имели спонтанную активность от 0 до 15 имп./с при температуре 32—34°C. Реакции на ионофоретическое подведение ацетилхолина, подводимого к спонтанно активным нервным клеткам, характеризовались умеренным приращением импульсации от 3—5 до 12—15 имп./с. У спонтанно неактивных нейронов и у нейронов с эпизодической активностью реакции на ацетилхолин появлялись только при температуре выше 34°C. В этой группе нейронов обнаружены наиболее мощные реакции на стандартное подведение ацетилхолина — приращение импульсации над уровнем фона у них составило 30 имп./с. и более (рис. 3Б).

В группе «молчащих» при 32—34°C нейронов удается наиболее отчетливо проследить, как меняется скорость холинергического процесса с ростом температуры до нормальных для теплокровных значений. На рис. 3А, I показано, что у некоторых нейронов, не отвечавших на ацетилхолин при 32—34°C, с увеличением температуры всего на 2—3°C начинают возникать мощные реакции на ацетилхолин с приращением импульсной активности над фоном до 10—16 имп./с. Более того, у тех же нейронов приближение температуры к отметке 36°C приводит к появлению стабильной спонтанной активности, уровень которой доходит до 6—12 имп./с (рис. 3А, II). Следовательно, при нормальной для теплокровных

температуре мозга возможности для регулирования спонтанной активности нейронов под влиянием ацетилхолина резко возрастают, а вместе с ними возрастают и совершенствуются приспособительные реакции организма.

Для реализации преимуществ, которыми обладает мозг при высокой температуре, требуются большие энергетические затраты. В одной из первых работ, посвященных изучению особенностей реакций нейронов коры на ионофоретическое подведение ацетилхолина, было обнаружено, что при действии блокаторов энергетического метаболизма или при создании кратковременного аноксического состояния активация, вызываемая ацетилхолином подавляется вместе со снижением уровня спонтанной активности при практически полной сохранности возбуждения, вызываемого глутаматом [20]. В экспериментах по изучению последствий иммерсионной гипотермии было показано, что напряжение кислорода в коре мозга крыс существенно возрастает после понижения температуры с 37 до 34°C [1]. Следовательно, при температуре ниже 34°C, когда происходит резкое снижение скорости холинергического процесса (рис. 3А), нервная ткань перестает утилизировать значительное количество кислорода, поступающего в мозг. Дальнейшее охлаждение приводит к уменьшению потребления кислорода нервной тканью примерно в 5 раз [4]. Таким образом, высокие энергетические потребности мозга при его функционировании связаны со значительной энергоемкостью М-холинергического процесса при температуре 35—36°C и выше. Это обстоятельство ставит работу нервной системы в жесткую зависимость от энергетического обеспечения. В мозге отсутствуют какие-либо энергетические резервы [4], поэтому даже незначительное снижение скорости энергетического метаболизма немедленно приводит к формированию гипоксического состояния. В этом мы убедились при проведении термобиологических экспериментов на переживающих срезах сенсомоторной коры по методике, описанной выше. Данные, полученные на 16 нервных клетках, первыми зарегистрированными в экспериментах, что исключало влияние предшествующих температурных воздействий, показали, что рост температуры выше 34°C очень быстро приводит к статистически значимому ( $p < 0,001$ , критерий Уилкоксона — Манна — Уитни) уменьшению амплитуды спайков (рис. 4). Обращает на себя внимание разнообразие изменений этого параметра у разных нейронов, но направленность изменений была одинаковой для всех. Снижение амплитуды спайков было приурочено именно к той температурной зоне, в которой обнаружено резкое увеличение эффективности активационной реакции на ацетилхолин и рост частоты спонтанной активности (рис. 3А).

Несмотря на то, что повышение температуры инкубационной жидкости до 35—36°C длилось всего несколько минут, полного восстановления амплитуды спайков после возвращения исходной температуры (32—34°C) не обнаружено ни у одного нейрона. В большинстве случаев (12 нейронов) падение амплитуды спайков, связанное с нагреванием инкубационной среды, продолжалось после восстановления температуры до 32—34°C (рис. 5Б) и в конце концов нейроны переставали выделяться из фона. Средние величины изменения амплитуды спайков в процентах по отношению к значениям до нагревания показаны на рис. 5А. Амплитуда спайков достоверно снизилась при нагревании ( $p < 0,001$ , критерий Уилкоксона—Манна—Уитни) до  $76,7 \pm 3,2\%$  (рис. 5А,1,2) и продолжала падать при восстановлении температуры до исходных значений ( $18,7 \pm 8,6\%$ ) (рис. 5А,3). Эти данные высоко достоверны как по отношению к величине спайков до нагревания, так и к значениям при  $t = 35—36^\circ\text{C}$  ( $p < 0,001$ ). Возобновления активности нейронов при ее полном исчезновении в результате значительного снижения амплитуды спайков не удалось обнаружить в течение 1 часа инкубирования при стандартной температуре 32—34°C. Дальнейшие наблюдения не проводились.

Полученные результаты позволяют сделать несколько выводов. Прежде всего они подтверждают, что

скорость холинергической реакции при температуре выше 34°C действительно очень значительно возрастает. В связи с этим недостаточное снабжение нейронов энергетическим субстратом при искусственном инкубировании [2] создает конкурентные условия за доступ к энергоносителям между холинергической реакцией, обеспечивающей функциональное регулирование состояния  $\text{K}^+$  проницаемости нейрональных мембран, и метаболическими реакциями, поддерживающими жизнеспособность самих нервных клеток. Поскольку на поддержание жизнедеятельности нейронов из общего энергетического баланса нервной ткани тратится всего 10—15% энергоресурсов [4], все остальное идет на обеспечение специальной функции мозга по формированию приспособительных реакций, т.е. именно на высокоскоростной (при  $t > 34^\circ\text{C}$ ) холинергический процесс. Нетрудно видеть, что в условиях гипоксии метаболические реакции нейронов, поддерживающие ионный гомеостаз, сразу, как только температура мозга становится выше 34°C, начинают испытывать энергетический голод, не в состоянии конкурировать с мощнейшим потребителем энергии, каким является холинергический процесс при этой температуре. Падение амплитуды спайков является следствием сниженной активности трансмембранных переносчиков, что является первым признаком наступления гипоксического состояния мозга [5, 28].

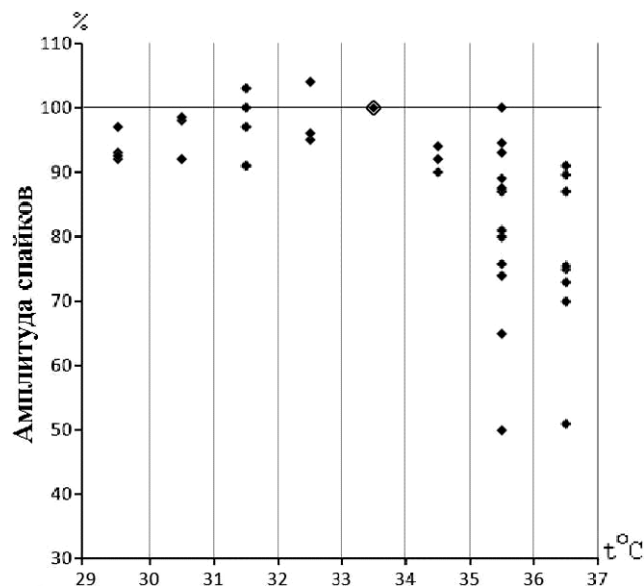


Рис. 4. Амплитуда спайков нейронов сенсомоторной коры в температурном диапазоне 29—37°C по отношению к значениям при  $t = 33^\circ\text{C}$ .

Данные для отдельных нейронов изображены ромбами и представлены в процентах по отношению к значению амплитуды спайка, которую каждый нейрон имел при  $t = 33^\circ\text{C}$  (единица для всех нейронов ромб, обведенный контуром).

Нагреванию и охлаждению от 33°C подвергались разные нейроны, зарегистрированные первыми в эксперименте.

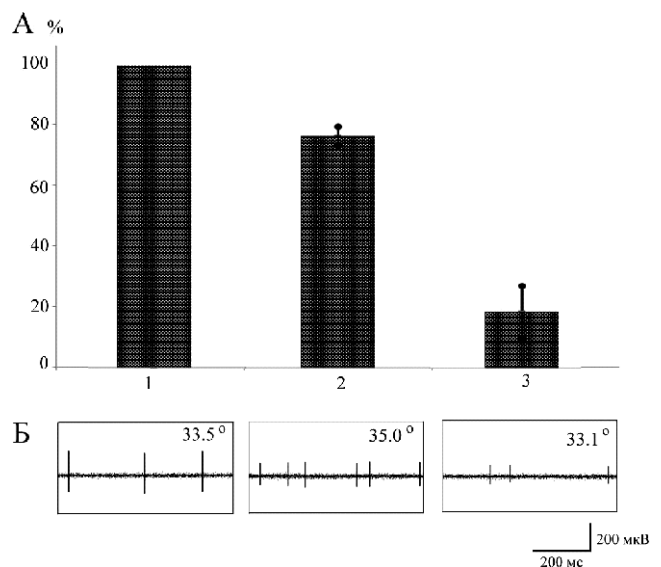


Рис. 5. Изменение амплитуды спайков нервных клеток при нагревании инкубационной среды от 32—34 до 35—37°C и последующем восстановлении температуры: А — усредненные для 16 нейронов данные по изменению амплитуды спайков при 35—37°C (2) и при последующем восстановлении температуры до 32—34°C (3) по сравнению с исходными значениями до нагревания (32—34°C), принятыми за 100% (1). Весь цикл повышения температуры инкубационной среды от 32—34 до 35—37°C и ее восстановления длился не более 5—6 мин; Б — изменение амплитуды спайков, связанное с нагреванием инкубационной среды

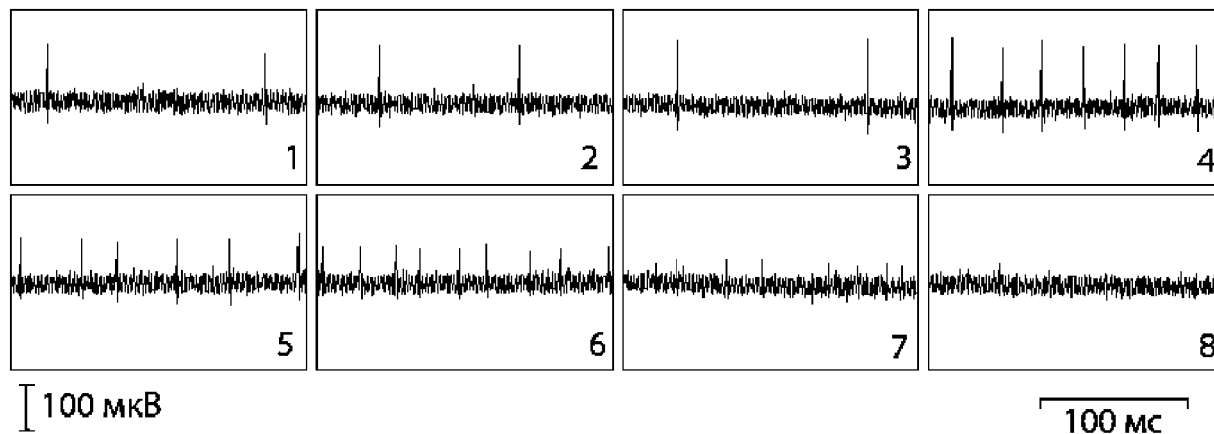


Рис. 6. Фрагменты записи активности нейрона сенсомоторной коры бодрствующего кролика до и на разных этапах после внутривенного введения этанола:

1) до введения этанола; 2) сразу после окончания введения этанола в дозе 0,6 г/кг; 3) через 10 минут; 4), 5), 6), 7) соответственно через 40, 45, 50, 55 мин; 8) через 1,5 ч

Второй вывод состоит в том, что недостаточное энергетическое снабжение  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, длящееся в течение всего нескольких минут, надолго переводит фермент в неактивное состояние, что может явиться причиной отдаленных повреждающих последствий, вызванных гипоксией [28].

Третий вывод непосредственно связан со вторым: длительное снижение активности  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы не только приводит к прогрессирующей потере амплитуды спайков нейронов, подвергшихся гипоксическому воздействию, но и к изменению состава экстраклеточной среды, в частности, к значительному росту экстраклеточной концентрации ионов  $\text{K}^+$  [28].

Экспериментами последних лет, проведенными на бодрствующих кроликах, по методике, описанной в первой части статьи, удалось обнаружить, что действие наркотических препаратов (умеренная доза алкоголя) и центральных анестетиков (гексенал) связаны со снижением энергетического метаболизма нейронов, т.е. с развитием гипоксических состояний разной степени выраженности. В силу того, что гипоксическое состояние создает отставленные эффекты, связанные с длительной блокадой  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, импульсная активность каждого нейрона регистрировалась на протяжении всего экспериментального дня до и после подведения препаратов. Оба препарата вводились в краевую вену уха кролика в дозе 0,6 г/кг (этанол) и 50 мг/кг (гексенал) в разных экспериментальных сериях. Регистрировали импульсную активность нейронов, а также электромиографическую реакцию мышц-разгибателей запястья в ответ на ЭКР передней конечности. На рис. 6 показано, как постепенно под влиянием этанола развивается гипоксическое состояние мозга. Ни во время введения препарата, длившегося примерно 5 мин, ни долгое время после спонтанная импульсная актив-

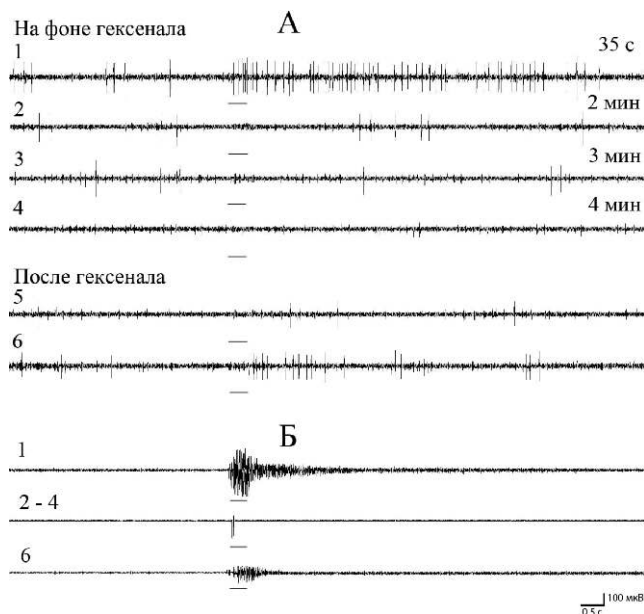


Рис. 7. Фрагменты записи активности нейрона сенсомоторной коры бодрствующего кролика и ЭМГ-активности мышц-разгибателей запястья в фоне и в ответ на ЭКР передней конечности на разных этапах внутривенного введения гексенала и после прекращения его действия:

А — фоновая импульсная активность нейрона и ответ на ЭКР при внутривенном введении гексенала в дозе 50 мг/кг через 35 с после начала введения (1); 2), 3), 4) — соответственно на 2-й, 3-й, 4-й минуте действия гексенала; 5), 6) — через 7 и 15 мин после прекращения введения гексенала;

Б — ЭМГ активность мышц-разгибателей запястья в те же сроки на фоне действия гексенала и после прекращения его введения: 1) через 35 с после начала введения; 2), 3), 4) на 2–4-й минуте во время введения; 6) при восстановлении ЭМГ ответа на ЭКР через 15 мин после прекращения введения гексенала.

Время действия электрокожного раздражения отмечено чертой под каждой осциллограммой.

ность нейрона не изменялась ни по амплитуде, ни по частоте (рис. 6,1,2,3). Только через 40 мин после введения этанола начинается постепенный подъем частоты импульсации (рис. 64—6 по сравнению с 1—3), что сопровождается падением амплитуды спайков, вплоть до их полного исчезновения через 1,5 ч (рис. 68). При этом ЭМГ реакции на электрокожное раздражение передней конечности ни во время введения этанола, ни в последующем в течение нескольких часов регистрации не прекращались. Из 13 нейронов, активность которых удавалось регистрировать в течение всего экспериментального дня, у 9 нервных клеток внутривенное введение умеренной дозы алкоголя вызывало прогрессивное падение амплитуды спайков спустя несколько десятков минут и практически полное их исчезновение через 0,5—2,5 ч после инъекции. Полного восстановления амплитуды спайков не удавалось обнаружить на протяжении 5—6-часового наблюдения. Полученные данные говорят о том, что гипоксическое состояние при действии алкоголя развивается довольно медленно, но приводит к тем же результатам, которые были обнаружены и в срезах мозга — падение амплитуды спайка на долгие часы после непродолжительного уменьшения нормального энергетического снабжения нейронов.

Совершенно иначе развивалось гипоксическое состояние при действии гексенала. Уже на 2-й минуте после начала его введения происходило исчезновение продолжительного длиннолатентного активационного ответа на ЭКР (рис. 7А,1 и 2), что приводило к прекращению двигательного ответа на стимуляцию (рис. 7Б,1 и 2—4). Примерно к 4-й минуте действия препарата исчезала спонтанная активность (рис. 7А,4). В этот же период пропадал роговичный рефлекс — животное погружалось в бессознательное состояние. Частичное восстановление регистрируемых показателей наступало через 15 мин после 5-минутного введения гексенала (рис. 7А, 6 и Б,6).

Снижение энергетического снабжения нейронов, таким образом, приводит к разным последствиям в зависимости от глубины энергетического дефицита. Действие системных анальгетиков резко снижает синтез макроэргических молекул в нейронах до уровня, когда проявление холинергического процесса в мозге становится невозможным. Это влечет за собой значительное ослабление неспецифических импульсных реакций на раздражитель и снижение уровня спонтанной активности нейронов. Формирования адаптивных реакций в этом случае не происходит, наступает бессознательное состояние.

Если ограничение энергоснабжения происходит не более чем на 15%, оставшихся 85% оказывается достаточно для полного развертывания М-холинергического процесса. Адаптивные функции при этом не на-

рушаются, но в силу высокой скорости холинергического регулирования спайковой активности низкоскоростные метаболические реакции, обеспечивающие физиологическое выживание нейронов, начинают испытывать энергетический дефицит. Это и приводит к прогрессивному падению амплитуды спайков, а в случае длительного сохранения гипоксического состояния — к массовой гибели нейронов [5, 28]. Но прежде, чем это случится, в мозге может возникнуть удивительное состояние, когда из-за ограничения активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы во внеклеточном пространстве нейронов накопится повышенное содержание  $\text{K}^+$ . В связи с падением концентрационного градиента по  $\text{K}^+$  между внешней и внутренней средой,  $\text{K}^+$  ток утечки будет частично снижен и возникнет неадаптивное повышение спонтанной активности (рис. 6:4-6) за счет улучшения проводящей функции дендритов [32] для стационарного потока миниатюрных ВПСП [34]. Регулирование этого потока с помощью выброса ацетилхолина формирует адаптивное поведение, а с помощью высокой концентрации внеклеточного  $\text{K}^+$  создает эйфорические состояния.

### Список литературы

1. **Вовенко Е.П.** Напряжение кислорода в мозгу крысы при острой иммерсионной гипотермии // Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. — 1993. — Т. 79, №1. — С. 119—121.
2. **Годухин О.В., Малахова В.И., Калемнев С.В.** Динамика функционального состояния переживающего среза мозга и факторы, вызывающие его нарушение // Успехи физиол. наук. — 1992. — Т. 23, №1. — С. 40—57.
3. **Зеймаль Э.В., Шелковников С.А.** Мускариновые холинорецепторы. — Л.: Наука, 1984.
4. **Иванов К.П.** // Основы энергетики организма.
4. Энергоресурсы организма и физиология выживания. — СПб.: Наука, 2004.
5. **Исмагилов М.Ф.** Ишемический мозговой инсульт: терминология эпидемиология, принципы диагностики, патогенетические подтипы, терапия острого периода заболевания // Неврологический вестник. — 2005. — Т. 37, №1—2. — С. 67—76.
6. **Медникова Ю.С.** Активность нейронов моторной зоны коры при выработке локального инструментального оборонительного рефлекса у кроликов // Журн. высш. нерв. деят. — 1983. — Т. 33, №6. — С. 1067—1072.
7. **Медникова Ю.С., Копытова Ф.В., Жадин М.Н.** Уровень спонтанной активности и импульсные ответы корковых нейронов на локальное подведение возбуждающих аминокислот к дендритам и соме // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. — 2008. — Т. 94, №5. — С. 502—511.
8. **Медникова Ю.С., Копытова Ф.В., Жадин М.Н.** Спонтанная активность корковых нейронов *in vitro* и ее регулирование под воздействием ацетилхолина // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. — 2009. — Т. 95, №8. — С. 820—829.
9. **Полянский В.Б., Евстихин Д.В., Соколов Е.Н., Крючкова А.В.** Ограниченная пластичность нейронов различения зрительной коры и гиппокампа кролика в



процедуре oddball (случайных замен) // Журн. высш. нерв. деят. — 2005. — Т. 55, №3. — С. 360—367.

10. Тимофеева Н.О., Котляр Б.И., Попович Л.Д. Анализ нейронного механизма условнорефлекторного переключения // Журн. высш. нерв. деят. — 1982. — Т. 32, №5. — С. 879—887.

11. Чернышев Б.В., Майоров В.И., Москвитин А.А. Облегчение и угнетение под влиянием ионофоретической аппликации ацетилхолина разных компонентов реакций нейронов двигательной коры кошки при выполнении условного рефлекса постановки лапы на опору // Журн. высш. нерв. деят. — 1998. — Т. 48, №1. — С. 99—112.

12. Экклс Дж. // Физиология нервных клеток. — М.: Иностран. Лит., 1959. (Eccles J.C. // The Physiology of Nerve Cells. — Baltimore: J. Hopkins Press, 1957).

13. Acquas E., Wilson C., Fibiger H.C. Conditioned and unconditioned stimuli increase frontal cortical and hippocampal acetylcholine release: effects of novelty, habituation, and fear // J. Neurosci. — 1996. — Vol. 16, №39. — P. 3089—3096.

14. Bastian J., Nguyenkim J. Dendritic modulation of burst-like firing in sensory neurons // J. Neurophysiol. — 2001. — Vol. 85, №1. — P. 10—22.

15. Brown D.A., Buckley N.J., Caulfield M.P. et al. Coupling of muscarinic acetylcholine receptors to neural ion channels: closure of K<sup>+</sup> channels // Molecular Mechanisms of Muscarinic Acetylcholine Receptor Function / Ed. by J. Wess. — New York, Berlin, Heidelberg: Springer R.G. Laudes Company. — 1995. — P. 165—182.

16. Conejo N.M., Gonzales-Pardo H., Vallejo G., Arias J.L. Changes in brain oxidative metabolism induced by water maze training // Neurosci. — 2007. — Vol. 145. — P. 403—412.

17. Evarts E.V. Pyramidal tract activity associated with a conditioned hand movement in the monkey // J. Neurophysiol. — 1966. — Vol. 29, №6. — P. 1011—1026.

18. French-Mullen J.M.H., Hori N., Nakanishi H. et al. Asymmetric distribution of acetylcholine receptors and M channels on prepyriform neurons // Cellular and Molecular Neurobiol. — 1983. — Vol. 3, №2. — P. 163—181.

19. Fox P.T., Raichle M.R., Mintun M.A., Dence C. Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity // Science. — 1988. — Vol. 241, №4864. — P. 462—464.

20. Godfraind J.M., Kawamura H., Krnjevic K., Pumain R. Actions of dinitrophenol and some other metabolic inhibitors on cortical neurones // J. Physiol. — 1971. — Vol. 215, №1. — P. 199—222.

21. Hori Y., Minamimoto T., Kimura M. Neuronal encoding of reward value and direction of actions in the primate

putamen // J. Neurophysiol. — 2009. — Vol. 102. — P. 3530—3543.

22. Inglis F.M., Fibiger H.C. Increases in hippocampal and frontal cortical acetylcholine release associated with presentation of sensory stimuli // Neurosci. — 1995. — Vol. 66, №1. — P. 81—86.

23. Kasischke K.A., Vishwasrao H.D., Fisher P.J. et al. Neural activity triggers neural oxidative metabolism followed by astrocytic glycolysis // Science. — 2004. — Vol. 305, №2. — P. 99—103.

24. Klein W.L. Biochemistry and regulation of signal transduction by neural acetylcholine receptors // Current Topics in Cellular Regulation. — Vol. 24. Enzyme catalysis and control (Eds. M.DeLuca, H.Lardy, R.L.Cross). — Orlando: AP — 1984. — P. 129—144.

25. Krnjevic K., Pumain R., Renaud L. The mechanism of excitation by acetylcholine in the cerebral cortex // J. Physiol. — 1971. — Vol. 215, №1. — P. 247—268.

26. Laughlin S.B., Attwell D. Neural energy consumption and the representation of mental events // Brain Energetics and Neuronal Activity. (Eds. R.G. Shulman, D.L. Rothman). — Chichester: Wiley a.Sons, 2005. — P. 111—124.

27. Lecas J.-C., Requin J., Anger C., Vitton N. Changes in neural activity of the monkey precentral cortex during preparation for movement // J. Neurophysiol. — 1986. — Vol. 56, №6. — P. 1680—1702.

28. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons // Physiol. Rev. — 1999. — Vol. 79, №1. — P. 1131—1568.

29. MacGregor R.J. A model for responses to activation by axodendritic synapses // Biophys. Journal. — 1968. — Vol. 8, №3. — P. 305—318.

30. McCormick D.A., Prince D.A. Mechanisms of action of acetylcholine in the guinea-pig cerebral cortex in vitro // J. Physiol. — 1986. — Vol. 375. — P. 169—194.

31. Mednikova Y.S., Karnup S.V., Loseva E.V. Cholinergic excitation of dendrites in neocortical neurons // Neurosci. — 1998. — Vol. 87, №4. — P. 783—796.

32. Rall W., Burke R.E., Holmes W.R. et al. Matching dendritic neuron models to experimental data // Physiol. Rev. — 1992. — Vol. 72 (Suppl.). — P. S159—S186.

33. Swanson R.F., Morton M.M., Sagar S.M., Sharp F.R. Sensory stimulation induces local cerebral glycolysis: demonstration by autoradiography // Neurosci. — 1992. — Vol. 51, №2. — P. 451—461.

34. Williams S.R., Stuart G.L. Dependence of EPSP efficacy on synapse location in neocortical pyramidal neurons // Science. — 2002. — Vol. 295. — P. 1907—1910.

Поступила 21.03.12

#### Сведения об авторах:

Кожечкин Сергей Николаевич, канд. мед. наук, вед. науч. сотр., лаб.фармакологической регуляции состояний зависимости ФГБУ «НИИФ им. В.В. Закусова» РАМН

Копытова Фелицата Владимировна, канд. биол. наук, старш. науч. сотр., лаб. функциональной синаптологии ФГБУН «НЦН» РАМН

Коштоянц Олег Хачатурович, д-р биол. наук, старш. науч. сотр. лаб. нейрохимических механизмов обучения и памяти ФГБУ «ИВНД и НФ» РАН

И.Ю. Малышев<sup>1,2</sup>, С.В. Круглов<sup>1,2</sup>, С.В. Лямина<sup>1</sup>

## **Гипоксия, воспаление и фенотипическая пластичность макрофагов: центральная роль HIF-1 и NFκB**

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико-стоматологический университет» Министерства здравоохранения и социального развития РФ, 127473, Москва, ул. Делегатская, 20/1

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

*Снижение содержания кислорода, т.е. гипоксия, в тканях и клетках организма, часто является важным патогенетическим компонентом большого количества заболеваний. В этих случаях гипоксия не только сама по себе является важным компонентом патогенеза заболеваний, но и может оказывать влияние на иммунные реакции, от которых зависит исход этих заболеваний. При этом накопление макрофагов в гипоксических областях и их реакция на гипоксию является ключевым моментом в понимании механизмов влияния гипоксии на иммунитет. Макрофаги играют исключительно важную роль в запуске врожденного иммунного ответа и определяют вектор развития адаптивного ответа. В обзоре проанализированы современные данные о влиянии гипоксии на фенотип и пластичность макрофагов, а также генетические особенности реакции макрофагов на гипоксию. Проанализированы молекулярные механизмы реакции иммунных клеток на гипоксию и роль факторов транскрипции HIF-1 и NF-κB. В совокупности это позволило описать важный биологический феномен — гипоксия-регулируемого контроля фенотипической пластичности макрофагов и обозначить пути поиска новых эффективных подходов в терапии заболеваний связанных с гипоксическими нарушениями иммунитета.*

**Ключевые слова:** гипоксия, HIF-1, NF-κB, воспаление, макрофаги, фенотипическая пластичность макрофагов

I.Yu. Malyshev<sup>1,2</sup>, S.V. Kruglov<sup>1,2</sup>, S.V. Lyamina<sup>1</sup>

## **Hypoxia, inflammation and phenotypic flexibility of macrophages: the central role of HIF-1 and NFκB**

<sup>1</sup> Moscow State University of Medicine and Dentistry, 20/1, Delegatskay str., Moscow, 127473, Russia

<sup>2</sup> Institute of general pathology and pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

*Decrease of oxygen concentration, i.e. hypoxia, in organism tissues and cells is an important pathogenetic component in a large number of diseases. In these cases hypoxia is not only an important component of diseases pathogenesis, but can also influence immune reactions determining the outcome of diseases. Thus, concentration of macrophages in hypoxic areas and their reaction to hypoxia are the key moments in understanding the mechanisms of hypoxia influence on immunity. Macrophages are of the utmost importance in the congenital immune startup and define the vector of development of the adaptive response. In this review we present updated data on influence of hypoxia on macrophages phenotype and their plasticity, and we also analyze genetic trait of macrophages reaction to hypoxia. Molecular mechanisms of immune cells reaction on hypoxia and the role of transcription factors, HIF-1 and NF-κB, are analyzed. As a whole, it allowed to describe an important biological phenomenon — hypoxia-regulated control of macrophages phenotypic plasticity, and to define ways of search of new effective approaches to the management of diseases with hypoxic disturbances.*

**Key words:** hypoxia, HIF-1, NF-κB, inflammation, macrophages, macrophages phenotypic plasticity

**Для корреспонденции:** Малышев Игорь Юрьевич, д-р мед. наук, проф., зав. лаб. стресса и адаптации ФГБУ «НИИОПП» РАМН, зав. каф. патологической физиологии лечебного факультета, ГБОУ ВПО «МГМСУ» Минздравсоцразвития РФ. E-mail: iymalyshev1@gmail.com

Для нормального функционирования организма необходимо адекватное снабжение органов и тканей кислородом. Поэтому, снижение содержания кислорода, т.е. гипоксия, в тканях и клетках организма, часто является важным патогенетическим компонентом большого количества заболеваний. В здоровых тканях напряжение кислорода ( $pO_2$ ) составляет, как правило, от 20 до 70 мм рт.ст., тогда как в зонах гипоксии — менее 10 мм рт.ст. [42]. Гипоксия может быть обусловлена недостатком кислорода во вдыхаемом воздухе, недостаточным поступлением кислорода в организм, недостаточным транспортом кислорода к клеткам или нарушением утилизации кислорода в митохондриях. Кроме того, гипоксия может возникать при нарушении кровоснабжения органов в результате развития многих патологий и заболеваний. Это происходит при злокачественных новообразованиях [54], кожных ранах [7], атеросклеротических бляшках [53], переломах костей [8], гипотонии [14], в суставах, пораженных ревматоидным артритом [48], а также при ишемии органов [22]. В этих случаях гипоксия не только сама по себе может быть важным компонентом патогенеза заболеваний, но и оказывать влияние на иммунные реакции, от которых зависит исход этих заболеваний.

*Гипоксия оказывает существенное влияние на развитие воспаления и иммунных реакций организма*

Показано, что гипоксия может индуцировать развитие воспаления. Например, у лиц с горной болезнью отмечается достаточно высокий уровень циркулирующих цитокинов, а пропотевание жидкости вызывает отек легких или головного мозга [20]. Увеличение в сыворотке уровня IL-6, рецептора IL-6 и C-реактивного белка — маркеров воспаления — отмечено у здоровых добровольцев на высоте более 3400 м [23]. У мышей после кратковременной гипоксии наблюдалось изменение проницаемости сосудов, накопление воспалительных клеток во многих органах и повышение уровня цитокинов в сыворотке [13, 45].

Развитие воспаления в ответ на гипоксию является звеном патогенеза разных заболеваний. Так, например, гипоксия/ишемия в органных трансплантатах увеличивает риск воспаления и отторжения трансплантата [5, 31]. В других исследованиях установлено, что при ожирении возникает дисбаланс между потребностью и потреблением кислорода в адипоцитах увеличенного размера, и именно это вызывает тканевую гипоксию. Возникающая в ответ на гипоксию инфильтрация жировой ткани макрофагами и хроническое системное воспаление способствуют развитию инсулинорезистентности [57].

В поврежденных тканях в гипоксических областях действительно очень часто отмечается выраженное накопление иммунных клеток, и, прежде всего макро-

фагов [34]. Увеличение количества макрофагов обнаружено в лишенных сосудов и некротических участках в грудных железах [33], гипоксических зонах кожных ран [33], в зоне атеросклеротических бляшек [30] и в ишемических зонах ретинопатии [15].

Оказалось, что макрофаги могут функционировать в таких неблагоприятных условиях благодаря изменению экспрессии генов и адаптации к гипоксии. При этом, гипоксия может вызывать значимые изменения секреторной активности макрофагов, стимулируя высвобождение проангиогенных и воспалительных цитокинов, а также вызывать изменение морфологии макрофагов [34]. Так, показано, что гипоксия вызывает снижение числа митохондриальных крист, увеличение внутриклеточных «липидных пузырьков» и замедление роста филоподий и «уплощение» макрофагов [6].

При действии гипоксии на макрофаги и другие иммунные клетки происходит изменение спектра поверхностно-клеточных маркеров. Так, например, моноциты отвечают на гипоксию увеличением экспрессии интегринов CD11b/CD18 [47].

Важным аспектом влияния гипоксии на иммунитет являются ее эффекты на выживаемость иммунных клеток. Как правило, гипоксия вызывает гибель клеток за счет апоптоза [34]. Вместе с тем, иммунные клетки могут хорошо переживать периоды гипоксии, и даже функционировать в гипоксических зонах, благодаря активации защитных антиапоптотических механизмов, таких, как накопление белков теплового шока HSP70 [58] и белка с молекулярной массой 150 kDa (ORP150) [43]. Интересно, что более устойчивые к гипоксии макрофаги морфологически отличаются от менее устойчивых. Устойчивые к гипоксии клетки имеют более уплощенную фибробластоподобную форму.

В совокупности эти данные клинических и экспериментальных исследований доказывают, что гипоксия оказывает существенное влияние на развитие иммунных реакций организма. При этом привлечение и скопление макрофагов в областях с низким содержанием кислорода, и изменение функциональной активности макрофагов в этих условиях является ключевым моментом понимания роли гипоксии в развитии иммунного ответа.

*Макрофаги играют центральную роль в развитии воспалительной реакции и иммунного ответа, в целом*

При взаимодействии с вирусами или бактериями, макрофаги продуцируют провоспалительные цитокины IL-12, IL-15, IL-23, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  и хемокины CXCL10, CCL8, CCL15, CCL19, CCL20 и CXCL13 [37] (рисунок). Хемокины привлекают в очаг воспаления нейтрофилы, естественные киллеры (ПК), CD4+ Т-лимфоциты (Th0) и CD8+ Т-лимфоциты (Т-клетки) [52]. IL-12 и TNF- $\alpha$  действуя

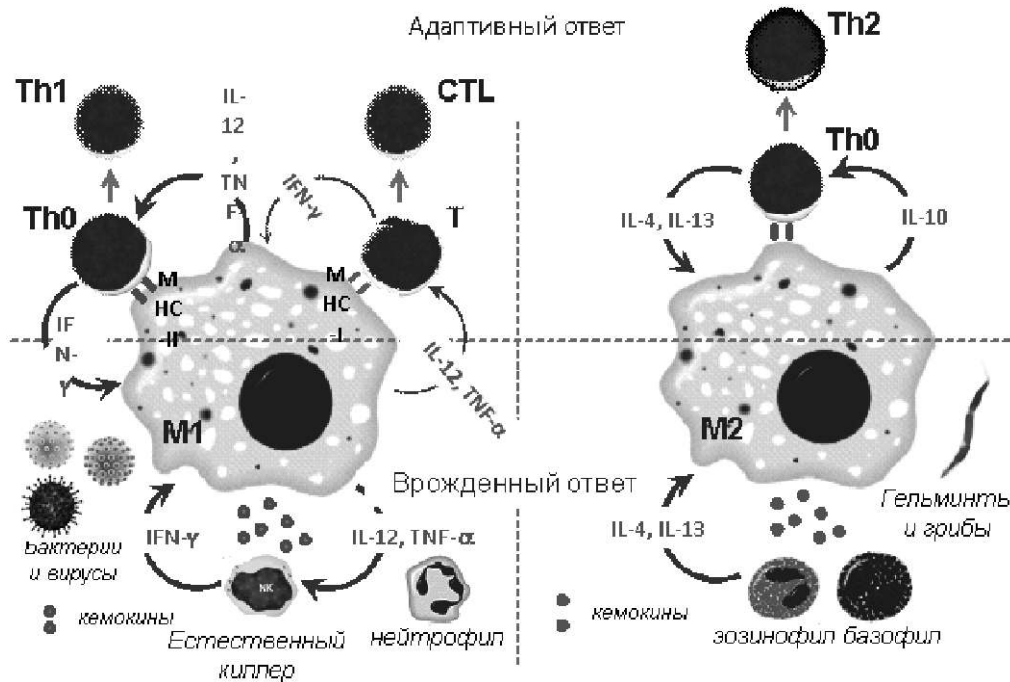
на ЕК и макрофаги, увеличивают секрецию этими клетками  $IFN-\gamma$ .  $IFN-\gamma$  еще больше стимулирует продукцию  $IL-12$  и  $TNF-\alpha$  макрофагами и усиливает их фагоцитарные и бактерицидные свойства. Когда макрофаги взаимодействуют не с бактериями и вирусами, а с экстраклеточными паразитами — грибами или гельминтами, макрофаги секретируют преимущественно противовоспалительные цитокины, такие, как  $IL-10$ ,  $IL-13$  и  $TGF-\beta$  [38] и хемокины  $CCL17$ ,  $CCL13$ ,  $CCL14$ ,  $CCL23$  и  $CCL26$  [37]. Эти хемокины привлекают  $Th0$  лимфоциты, эозинофилы и базофилы, продуцирующие  $IL-4$  и  $IL-13$  [16].  $IL-4$  и  $IL-13$  еще больше стимулируют макрофаги к секреции  $IL-10$  [16], который снижает продукцию провоспалительных цитокинов [12], активных форм кислорода (АФК) и  $NO$  [25], и таким образом, снижает бактерицидные свойства макрофагов.

Реакции макрофагов, ЕК, нейтрофилов, базофилов и эозинофилов на патогенные микробы или опухолевые клетки знаменует собой развитие врожденного иммунного ответа. При этом, в зависимости от природы патогена, происходит первая волна альтернативного программирования фенотипа макрофагов. Фенотип, формирующийся при действии внутриклеточных микробов и/или  $IFN-\gamma$ , получил название *классический* (провоспалительный) *M1 фенотип*, а фенотип, формирующийся при действии экстраклеточных паразитов и/или  $IL-4$  и  $IL-13$ , получил название *альтернативный* (антивоспалительный) *M2*

*фенотип* [28, 50]. В ходе иммунного ответа макрофаги могут менять свой фенотип. Например, в начале воспаления макрофаги могут иметь провоспалительный  $M1$  фенотип для того, чтобы убить патогенный микроб, а в конце — антивоспалительный  $M2$ , для того, чтобы предотвратить избыточное воспаление. Процесс смены фенотипа клетки получил название — «репрограммирование».

$M1$  макрофаги имеют округлую форму и продуцируют много провоспалительных цитокинов,  $NO$  и АФК [37, 50], которые обуславливают бактерицидную активность макрофагов. Маркерами  $M1$  являются рецептор  $IL-2$  и  $MAPK$  рецептор,  $CD80$ ,  $CD86$ ,  $CCR7$ ,  $CXCL10$ ,  $TLR-2$ ,  $TLR-4$ ,  $CD16$ ,  $CD32$ ,  $CD62$ ,  $IL-1R1$ ,  $CD127$ ,  $IL-15R$ ,  $IL-17R$  [37].  $M2$  макрофаги, напротив, имеют фибробластоподобную форму и продуцируют много антивоспалительных цитокинов, таких, как  $IL-10$  [37], и значительно меньше АФК и  $NO$ , чем  $M1$ . Маркерами  $M2$  являются маннозный рецептор,  $CD163$ ,  $Fc\epsilon RII$ , дектин-1,  $CD209$ ,  $DCIR$ ,  $CLACSF13$ ,  $FIZZ1$ ,  $ST2$ , фагоцитарные рецепторы  $SR-A$  и  $M60$ ,  $CXCR4$ ,  $CD184$ ,  $TRAIL$ ,  $IL-1R\alpha$  [37].

Для успешного уничтожения микроба или опухолевой клетки, макрофаги и *антиген-презентирующие клетки (АПК)* запускают адаптивный иммунный ответ, либо по клеточному  $Th1$  (T helper) и  $CTL$  (Cytotoxic T Lymphocytes) типу, либо по гуморальному  $Th2$  типу [28]. Информацию о целесообразно-



Функционально-клеточная организация врожденного и адаптивного (приобретенного) иммунных ответов. Объяснение в тексте

сти клеточного или гуморального типа адаптивного ответа обеспечивает специфический паттерн макрофагальных цитокинов [44]. Правильный выбор между Th1/CTL и Th2 чрезвычайно важен для успешного уничтожения патогенного фактора, а неадекватный — может лежать в основе разных заболеваний.

Клеточный иммунитет опосредован Th1 клетками и антиген-специфическими цитотоксическими лимфоцитами CTL (Cytotoxic T Lymphocytes). АПК могут представлять на свою поверхность антигены микробов и опухолевых клеток с помощью молекул МНС-II и МНС-I. МНС-II представляет антиген для CD4+ Th0 клеток, а МНС-I — для CD8+ Т клеток (рис. 1). Формирование клеточного ответа регулируют IFN- $\gamma$  и IL-12, синтезируемыми M1 фенотипом макрофагов. Эти и другие провоспалительные цитокины способствуют дифференцировке CD4+ Th0 клеток в Th1 клетки, а Т клеток в CTL. При этом IFN- $\gamma$  регулирует также экспрессию МНС-II на самих макрофагах и АПК [36], тогда как IL-12 усиливает продукцию IgG2a и подавляет IgG1 и IgE, которые ассоциированы с Th1 и Th2 типом ответа, соответственно [17].

Таким образом, M1 макрофаги интегрированы в Th1 и CTL ответы, которые убивают бактерии, вирусы и опухолевые клетки [50].

Гуморальный иммунитет опосредован Th2 клетками и В-лимфоцитами. Антигены экстраклеточных паразитов, M2 макрофаги и их противовоспалительные цитокины IL-10 и IL-4 потенцируют развитие Th0 клеток в Th2 [51]. IL-10 угнетает высвобождение провоспалительных цитокинов и продукцию активных форм O<sub>2</sub> и NO [9], и благодаря этому и угнетению экспрессии МНС-II подавляет развитие Th1 ответа.

Таким образом, M2 клетки интегрированы в Th2 ответ, который убивает экстраклеточных паразитов и обезвреживает токсины. Кроме того, M2 клетки регулируют воспаление, способствуют ремоделированию и репарации тканей, а также способствуют ангиогенезу и опухолевому росту [38].

В целом, можно сделать вывод, что при развитии адаптивного ответа происходит, зависимое от макрофагов, программирование CD4+ Th0 клеток в Th1 или Th2, а CD8+ лимфоцитов в CTL.

Интересно, что Th1 клетки и CTL продуцируют провоспалительные цитокины, аналогичные тем, которые продуцируют M1 макрофаги, а Th2 клетки — противовоспалительные цитокины, аналогичные тем, которые продуцируют M2 макрофаги. Провоспалительные цитокины Т клеток, действуя на макрофаги еще больше поляризуют их в сторону M1 фенотипа, а противовоспалительные — еще больше поляризуют макрофаги в сторону M2 фенотипа [39, 50]. Таким образом, происходит вторая, возвратная волна альтернативного программирования фенотипа макрофагов (ри-

сунок). Процесс взаимозависимого поступательно-возвратного репрограммирования иммунных клеток мы обозначили термином «матричное репрограммирование» [4].

Биологический феномен матричного репрограммирования иммунных клеток обеспечивает необходимую *пластичность иммунного ответа*, т.е. способность быстро менять направленность иммунных реакций с целью наиболее эффективного ответа на проникновение инфекции или изменения в окружающей среде. Представления о макрофаге как о клетке, которая имеет собственную фенотипическую пластичность (M1/M2) и может запускать матричное репрограммирование других иммунных клеток позволяет лучше понять принципы работы иммунной системы и механизмы её нарушения. В этом обзоре мы использовали эти представления применительно к гипоксии.

*Влияние острой гипоксии на фенотип макрофагов имеет двухфазный характер и зависит от исходного генетически детерминированного фенотипа этих клеток*

К настоящему времени мы уже имеем собственные экспериментальные данные [1] о том, каким образом острая гипоксия влияет на фенотип макрофагов и фенотипическую пластичность этих клеток, т.е. способность к репрограммированию (смене фенотипа), каким образом эти эффекты зависят от генетически детерминированного исходного фенотипа макрофагов, и наконец, каким образом генетически детерминированный фенотип макрофагов и тип иммунного ответа может влиять на устойчивость организма к острой гипоксии.

Известно, что разные генетические линии животных могут иметь разные исходные фенотипы макрофагов. Например, мыши линии C57/BL6 имеют преимущественно M1 фенотип, тогда как мыши Balb/c — M2 фенотип [55]. В наших экспериментах, мы использовали именно эти две линии мышей. В качестве маркеров фенотипа макрофагов мы использовали продукцию NO, форму клеток и поверхностно-клеточные маркеры. О приобретении макрофагами M1 фенотипа свидетельствовало увеличение продукции NO, увеличение количества макрофагов округлой формы и увеличение поверхностно-клеточных маркеров M1 фенотипа CD80 и CD25, а о приобретении M2 фенотипа — снижение продукции NO, увеличение количества макрофагов фибробластоподобной формы и увеличение маркеров M2 фенотипа CD163 и CD206 [41]. Условия острой гипоксии мы воспроизводили с помощью «подъема» животных в барокамере на высоту 9000 м. Фенотип макрофагов и фенотипическую пластичность макрофагов оценивали через 1 и 12 ч после острой гипоксии.

При определении фенотипа макрофагов через 1 ч после острой гипоксии, оказалось, что острая гипоксия практически не повлияла на фенотип макрофагов мышей BALB/c, но существенно «сдвинула» фенотип мышей линии C57/BL6 в сторону M2 фенотипа. Так, например, после острой гипоксии базальная и ЛПС-стимулированная продукция NO у макрофагов C57/BL6 были снижены более чем в 3 и 1,5 раза, соответственно, по сравнению с контролем [1]. Интересно, что реакция макрофагов на острую гипоксию оказалась как минимум двуфазной. Через 12 ч после острой гипоксии, в отличие от первого часа, и макрофаги мышей линии BALB/c, и макрофаги C57/BL6 стали менять свой фенотип в сторону провоспалительного M1 фенотипа.

Таким образом, при анализе реакции макрофагов на острую гипоксию необходимо учитывать две важные особенности:

1) реакция макрофагов на острую гипоксию существенно зависит от генетически детерминированного первоначального фенотипа клеток: M2 макрофаги мышей BALB/c в первые часы после острой гипоксии не меняют свой фенотип, тогда как M1 макрофаги мышей C57/BL6 трансформируют свой фенотип в сторону M2;

2) реакция макрофагов на острую гипоксию имеет две фазы: срочную (1-й ч) и отдаленную (12 ч). В M2 макрофагах мышей BALB/c первая фаза характеризуется отсутствием изменений фенотипа, а вторая отдаленная — выраженным смещением фенотипа в сторону провоспалительного M1. В M1 макрофагах мышей C57/BL6 реакция на острую гипоксию имеет инвертированный характер: первая стадия характеризуется существенным сдвигом в сторону M2 фенотипа, а вторая отдаленная — напротив смещением фенотипа в сторону провоспалительного M1.

В связи с этим возникает несколько резонных вопросов, почему в первый час после острой гипоксии макрофаги C57/BL6 (M1 фенотип) программируются гипоксией в сторону M2 фенотипа, а макрофаги BALB/c (M2 фенотип) остаются неизменными, и почему отдаленные последствия острой гипоксии проявляются провоспалительной реакцией макрофагов.

На сегодняшний день, известно большое количество факторов, которые могут изменять фенотип макрофагов в сторону M1 или M2 фенотипа. Так, провоспалительные цитокины IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , патоген-ассоциированные молекулы ЛПС, липопroteины, различные микробы и белки теплового шока способны программировать макрофаги на M1 фенотип, тогда как противовоспалительные цитокины IL-4 и IL-13, иммунные комплексы с IL-1 $\beta$ , IL-10, TGF- $\beta$ , некоторые внутриклеточные патогены, витамин D3,

глюкокортикоиды, апоптотические клетки способствуют формированию M2 фенотипа [38].

Факторы, которые репрограммируют фенотип макрофагов в сторону M1, мы обозначили как ФРМ1, а факторы, которые репрограммируют фенотип макрофагов в сторону M2 — как ФРМ2 [3]. Например, к ФРМ1 относятся IFN- $\gamma$  и пониженные концентрации сыворотки, а к ФРМ2 — IL-4 и повышенные концентрации сыворотки. Очевидно, что анализ перитонеальной жидкости, откуда мы выделяли макрофаги после острой гипоксии, мог бы помочь ответить на вопрос, какие из присутствующих ФРМ могли бы программировать макрофаги.

#### *Влияние острой гипоксии*

*на фенотипическую пластичность макрофагов  
зависит от исходного генетически  
детерминированного фенотипа этих клеток*

Для оценки фенотипической пластичности макрофагов, мы разработали специальную методику, основанную на использовании сыворотки (FBS) в концентрациях — 0%, 10%, 40%. Существование методики состояло в том, чтобы оценить способность макрофагов менять свой фенотип в сторону M1 под действием ФРМ1 — 0% FBS, и в сторону M2 под действием ФРМ2 — 40% FBS.

Оказалось, что в первый час после острой гипоксии изменения фенотипической способности макрофагов BALB/c и C57 практически не происходило. Влияние острой гипоксии проявилось в отдаленный период, через 12 ч. В макрофагах мышей BALB/c (исходный M2 фенотип) это проявилось увеличением способности макрофагов приобретать M1 фенотип, при отсутствии влияния на способность приобретать M2 фенотип. В макрофагах мышей C57/BL6 (исходный M1 фенотип) это проявилось, напротив, увеличением способности макрофагов приобретать M2 фенотип, при отсутствии влияния на способность приобретать M1 фенотип.

Таким образом, влияние острой гипоксии на фенотипическую пластичность существенно зависит от генетически детерминированного исходного фенотипа макрофагов. При этом в эффектах гипоксии наблюдается четкая альтернативная реципрокность: в M2 фенотипе макрофагов (BALB/c), гипоксия увеличивает способность приобретать M1 фенотип, и наоборот, в M1 фенотипе (C57) — способность приобрести M2 фенотип.

Оценка фенотипа и фенотипической пластичности иммунных клеток в клинике может иметь важное значение. Фенотипическая пластичность, то есть способность клеток менять свой фенотип играет ключевую роль в адекватном развитии иммунного ответа, когда например первоначальный провоспалительный ответ

(M1), направленный на уничтожение инфекции, должен смениться противовоспалительным (M2), направленным на предупреждение избыточного воспаления и повреждения здоровых тканей. Не исключено, что индуцированное гипоксией патологическое изменение пластичности может играть роль в развитии провоспалительных заболеваний, когда макрофаги приобретают избыточную способность менять свой фенотип на провоспалительный M1. Таким образом, оценка фенотипа макрофагов и их пластичности может иметь диагностическое значение. Кроме того, оценка фенотипической пластичности иммунных клеток может показать, каковы резервы для коррекции патологического фенотипа. И, наконец, методы коррекции фенотипа макрофагов и их пластичности может быть основой для разработки новых способов терапии гипоксических состояний.

*Мыши линии BALB/c (M2 фенотип) обладают большей устойчивостью к острой гипоксии по сравнению с мышами линии C57 (M1 фенотип)*

После того, как мы показали, что острая гипоксия оказывает существенное влияние на функциональный фенотип макрофагов, перед нами сразу стал вопрос, а существует ли обратное влияние, т.е. оказывает ли влияние генетически детерминированный фенотип макрофагов, и соответственно определенный тип иммунного ответа, на устойчивость животных к острой гипоксии. Тем более, что хорошо было известно, что разные популяции крыс могут существенно отличаться по своей устойчивости к острой гипоксии [2].

Устойчивость мышей к острой гипоксии, мы изучили на модели острой гипоксии, вызывающей гибель животных. В наших исследованиях [1] оказалось, что мыши линии BALB/c обладают значительно большей устойчивостью к острой гипоксии, чем мыши линии C57/BL6. Так при подъеме мышей на высоту 9000 м в барокамере погибло 63% мышей линии C57/BL6, и только 28% мышей линии BALB/c.

Понять почему макрофаги BALB/c, имеющие M2 фенотип, более устойчивы к репрограммирующему действию острой гипоксии (на первый час после острой гипоксии) и почему мыши BALB/c более устойчивы к острой гипоксии, по сравнению с C57/BL6, могут помочь данные J.K. Yun et al., 1997; Y. Tsukamoto et al., 1996 [58]. Эти авторы показали, что более устойчивые к гипоксии макрофаги морфологически отличаются от менее устойчивых. Устойчивые к гипоксии клетки имеют более уплощенную фибробластоподобную форму. Мы сегодня знаем, что такую форму имеют макрофаги M2 фенотипа. Эти данные согласуются с тем, что мыши BALB/c, имеющие более устойчивый к гипоксии фенотип клеток, имеют большую выживаемость при острой гипоксии, по сравнению с мышами линии C57/BL6, которые имеют M1 фенотип [58].

Тем не менее, мы пока не можем дать четкого ответа на вопрос, через какие молекулярные механизмы острая гипоксия оказывает влияние на активность иммунных клеток и связаны ли различия в смертности мышей разных генетических линий с различиями в фенотипе макрофагов и иммунном ответе на острую гипоксию. Для того, чтобы инициировать анализ и поиск ответов на эти важные вопросы, надо прежде разобраться с внутриклеточными молекулярными механизмами реакции макрофагов на гипоксию. Этому посвящена оставшаяся часть обзора.

*Молекулярные механизмы реакции иммунных клеток на гипоксию: роль HIF-1 и NF-kB-зависимого сигналинга и NO*

Известно, что во многих случаях эффекты гипоксии опосредуют сигнальные механизмы, связанные с гипоксическим фактором транскрипции HIF-1, а воспаления — с воспалительным фактором транскрипции NF-kB. При рассмотрении иммунных реакций и анализе механизмов репрограммирования иммунных клеток, HIF-1 привлек большое внимание, когда было обнаружено, что в условиях гипоксии, которая практически всегда формируется в фокусе воспаления, в иммунных клетках активируются HIF-зависимые сигнальные пути [11]. О значимой роли HIF-1 в развитии иммунных ответов также свидетельствуют данные, полученные на мышах с удаленным HIF-1 [46]. В этих и других экспериментах установлено, что HIF-1 каким-то образом вовлечен в бактерицидные эффекты макрофагов [11], но самое главное, обеспечивает возможность макрофагов выполнять свои функции в гипоксических условиях. Другой фактор транскрипции, NF-kB, который имеет хорошо доказанную роль в иммунных ответах, привлек внимание, когда обнаружилось, что гипоксия может приводить к деградации ингибитора этого фактора транскрипции [19] и таким образом активировать NF-kB.

*Роль HIF-1 в эффектах гипоксии на иммунные ответы*

В поддержании гомеостаза кислорода в организме и адаптации клетки к гипоксии главную роль играет активность HIF-1. HIF-1 представляет собой гетеродимер из конститутивно экспрессируемой субъединицы HIF-1 $\beta$  и субъединицы HIF- $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$  и HIF-2 $\alpha$ ), уровень которых тщательно регулируется содержанием кислорода [48]. Хотя HIF-1 $\alpha$  продуцируется непрерывно клетками с нормальным содержанием кислорода, он быстро разрушается с помощью убиквитин-зависимого протеолиза в присутствии кислорода [49]. Снижение уровня кислорода приводит к быстрому увеличению содержания субъединицы HIF-1 $\alpha$ , образованию гетеродимера и активации HIF-1. Активный HIF-1 связывается с чувствительными к гипоксии элементами HRE

генов, которые содержат последовательность 58-CGTG-38. HRE присутствуют в промоторах многих генов, отвечающих за метаболизм кислорода [49], поэтому при активации HIF-1 увеличивается экспрессия генов, белковые продукты которых усиливают транспорт кислорода, эритропоэз, ангиогенез и гликолиз [48], а также клеточную дифференцировку и апоптоз. Таким образом, HIF-1 помогает клетке оптимизировать клеточную энергопродукцию и гомеостаз для выживания и функционирования в среде со сниженным уровнем кислорода. Элементы, чувствительные к действию HIF-1, были обнаружены в генах, кодирующих Toll-like рецепторы (TLRs), включая TLR2 и TLR6, которые активируются в ответ на гипоксию [32]. Наконец, HIF-1 увеличивает высвобождение провоспалительных цитокинов и экспрессию костимулирующих молекул дендритными клетками, помогая активации врожденного и адаптивного иммунного ответов [27].

Нейтрофилы и макрофаги должны обладать хорошей способностью адаптироваться к условиям недостатка кислорода, поскольку многие патогенные бактерии прекрасно размножаются в гипоксических условиях. О значимой роли HIF-1 в развитии иммунных ответов свидетельствуют данные, полученные на мышцах с удаленным HIF-1 [26, 46]. Так, в макрофагах и нейтрофилах с удаленным HIF-1 отмечено существенное снижение уровня клеточного АТФ, что показывает значимую роль этого фактора транскрипции для энергопродукции путем гликолиза в иммунных клетках [11]. Макрофаги, изолированные от мышечной ткани с удаленным HIF-1, обладают сниженной способностью к обезвреживанию бактерий по сравнению с мышцами дикого типа [11]. Данные об активации HIF-1 в пораженных тканях пациентов с ревматоидным артритом [24], дерматомиозитом [29], волчанкой у новорожденных [10] и атеросклерозе [56] позволяют предположить важную роль HIF-1 при различных иммунопатологиях.

В условиях гипоксии, которая практически всегда формируется в очаге воспаления, в миелоидных клетках активируются HIF-зависимые сигнальные пути [11]. Активация HIF-1 позволяет иммунным клеткам проявлять в условиях гипоксии подвижность, бактериальную и фагоцитарную активность. Кроме того HIF-1 $\alpha$  за счет подавления апоптоза увеличивает продолжительность жизни нейтрофилов в условиях гипоксии в очаге воспаления. Анализ взаимодействия организма с патогеном выявили несколько аспектов функций макрофагов, которые зависят от HIF-1. Так увеличение уровней HIF-1 было обнаружено во время дифференцировки моноцитов крови в тканевые макрофаги [18]. Активность HIF-1 играет важную роль в фагоцитарном захвате бактерий макрофагами в условиях гипоксии [21], продукции макрофагами TNF- $\alpha$  и синтезе NO [6].

HIF-1 вовлечен не только в развитие, но и в регуляцию адаптивного иммунитета. Так, например, увеличение продукции HIF-1 $\alpha$  и активация HIF-1 в Т-клетках, за счет увеличения продукции интерлейкина-10 и снижения уровня IFN- $\gamma$ , способствует изменению фенотипа клеток с Th1, усиливающего клеточный адаптивный ответ и цитотоксические функции макрофагов и Т-клеток, на Th2 фенотип, ингибирующий Th1 ответ и бактерицидное действие макрофагов и Т-клеток. Показано, что HIF-1 также влияет на регуляторные Т-клетки, а именно стимулирует дифференцировку и пролиферацию этих Т-клеток и таким образом защищает ткани от чрезмерных эффектов цитотоксических Т-клеток.

### *Роль NF- $\kappa$ B*

#### *в эффектах гипоксии на иммунные ответы*

Выраженное влияние гипоксии на развитие иммунных реакций связано также с тем, что ключевой фактор транскрипции провоспалительных генов — NF- $\kappa$ B является кислородо-чувствительным [40]. Более того, имеются данные о наличии регуляторной связи между NF- $\kappa$ B и HIF-1 $\alpha$ , что хорошо объясняет влияние гипоксии на механизмы иммунитета и воспаления [42]. NF- $\kappa$ B — гетеродимерный фактор транскрипции, состоящий из субъединиц p65 и p50. В условиях нормального содержания кислорода NF- $\kappa$ B находится в неактивном виде в цитоплазме. Инактивацию NF- $\kappa$ B обеспечивает связывание ингибитора I- $\kappa$ Ba с субъединицами NF- $\kappa$ B. Это препятствует перемещению фактора транскрипции в ядро. Гипоксия индуцирует распад ингибитора I- $\kappa$ Ba и активацию NF- $\kappa$ B [19]. Активный NF- $\kappa$ B проникает в ядро и индуцирует в макрофагах гены PGE2 [35] IL-1, TNF- $\alpha$  и IL-12 [19].

Таким образом, открытые вопросы об изменении HIF-1- и NF- $\kappa$ B-контролируемых сигнальных путей в разных фенотипах макрофагов и при их репрограммировании существенно ограничивают наше понимание патогенеза воспалительных заболеваний, сопровождающихся клеточной и тканевой гипоксией. Дополнительные эксперименты могли бы привести к описанию важного биологического феномена — гипоксия-регулируемого контроля фенотипической пластичности макрофагов. Это, безусловно, расширит существующие представления о молекулярных механизмах воспалительной реакции и пластичности всего иммунного ответа. Данные о возможности модулирования гипоксией — зависимой регуляции функционального фенотипа макрофагов позволят искать новые эффективные подходы в терапии заболеваний, связанных с гипоксическими нарушениями иммунитета.

*Работа поддержана грантами ГК №П811 и ГК 16.740.11.0007 в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг.*



## Список литературы

1. **Круглов С.В., Калиш С.В., Малышева Е.В.** и соавт. Устойчивость к острой гипоксии и изменение фенотипа и фенотипической пластичности макрофагов мышей разных генетических линий // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. — 2012. — в печати.
2. **Лукьянова Л.Д.** Биоэнергетическая гипоксия: понятие, механизмы и способы коррекции // Бюл. эксперим. биол. и медицины. — 1997. — Т. 124, №9. — С. 244—254.
3. **Лямина С.В., Круглов С.В., Веденикин Т.Ю.** и соавт. Альтернативное репрограммирование M1/M2 фенотипа перитонеальных макрофагов мышей *in vitro* с помощью интерферона гамма и интерлейкина 4 // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2011. — 4. — С. 235.
4. **Малышев И.Ю.** Матричное репрограммирование иммунных клеток и роль его нарушения в патогенезе опухолей // Вестник РОНЦ. — 2012. — в печати.
5. **Andrade C.F., Kaneda H., Der S.** et al. Toll-like receptor and cytokine gene expression in the early phase of human lung transplantation // J. Heart Lung Transplant. — 2006. — Vol. 25. — P. 1317—1323.
6. **Angermuller S., Schunk M., Kusterer K.** Alteration in xanthine oxidase activity in sinusoidal endothelial cells and morphological changes of Kupffer cells in hypoxic and reoxygenated rat liver // Hepatology. — 1995. — Vol. 21. — P. 1594—1601.
7. **Arnold F., West D., Kumar S.** Wound healing: the effect of macrophage and tumour-derived angiogenesis on skin graft vascularisation // Br. J. Exp. Pathol. — 1987. — Vol. 68. — P. 569—574.
8. **Ayala A., Ertel W., Chaudry I.H.** Trauma-induced suppression of antigen presentation and expression of major histocompatibility class II complex in leukocytes // Shock. — 1995. — Vol. 5. — P. 79—90.
9. **Bogdan C., Vodovotz Y., Nathan C.** Macrophage deactivation by interleukin 10 // The Journal of Experimental Medicine. — 1991. — Vol. 174. — P. 1549—1555.
10. **Clancy R.M.** Role of hypoxia and cAMP in the transdifferentiation of human fetal cardiac fibroblasts: implications for progression to scarring in autoimmune-associated congenital heart block // Arthritis Rheum. — 2007. — Vol. 56. — P. 4120—4131.
11. **Cramer T., Yamanishi Y., Clausen B.E.** et al. HIF-1 $\alpha$  is essential for myeloid cell-mediated inflammation // Cell. — 2003. — Vol. 112. — P. 645—657.
12. **D'Andrea A., Aste-Amezaga M., Valiante N.M.** et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells // J. Exp. Med. — 1993. — Vol. 178(3). — P. 1041—1048.
13. **Eckle T., Faigle M., Grenz A.** et al. A2B adenosine receptor dampens hypoxia-induced vascular leak // Blood. — 2008. — Vol. 111. — P. 2024—2035.
14. **Ertel W., Singh G., Morrison M.H.** et al. Chemically induced hypotension increases PGE2 release and depresses macrophage antigen presentation // Am. J. Physiol. — 1993. — Vol. 264. — R655—R660.
15. **Esser P., Heimann K., Wiedemann P.** Macrophages in proliferative vitreoretinopathy and proliferative diabetic-retinopathy-differentiation of subpopulations // Br. J. Ophthalmol. — 1993. — Vol. 77. — P. 731—733.
16. **Falcone F.H., Haas H., Gibbs B.F.** The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses // Blood. — 2000. — Vol. 96(13). — P. 4028—4038.
17. **Germann T., Gately M.K., Schoenhaut D.S.** et al. Interleukin-12/T cell stimulating factor, a cytokine with multiple effects on T helper type 1 (Th1) but not on Th2 cells // Eur. J. Immunol. — 1993. — Vol. 23(8). — P. 1762—1770.
18. **Ghezzi P., Dinarello C.A., Bianchi M.** et al. Hypoxia increases production of interleukin-1 and tumour necrosis factor by human mononuclear cells // Cytokine. — 1991. — Vol. 3. — P. 189—194.
19. **Grimm S., Baeuerle P.A.** The inducible transcription factor NF- $\kappa$ B: structure-function relationship of its protein subunits // Biochem. J. — 1993. — Vol. 290. — P. 297—308.
20. **Grocott M.P.W., Martin D.S., Levett D.Z.H.** et al. Arterial blood gases and oxygen content in climbers on Mount Everest // N. Engl. J. Med. — 2009. — Vol. 360. — P. 140—149.
21. **Gyetko M.R., Todd R.F., Wilkinson C.C.** et al. The urokinase receptor is required for human monocyte chemotaxis *in vitro* // J. Clin. Invest. — 1994. — Vol. 93. — P. 1380—1387.
22. **Hammes H.P., Lin J.H., Bretzel R.G.** et al. Upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor system in experimental background diabetic retinopathy of the rat // Diabetes. — 1998. — Vol. 47. — P. 401—406.
23. **Hartmann G., Tschyp M., Fischer R.** et al. High altitude increases circulating interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and C-reactive protein // Cytokine. — 2000. — Vol. 12. — P. 246—252.
24. **Hollander A.P., Corke K.P., Freemont A.J., Lewis C.E.** Expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  by macrophages in the rheumatoid synovium: implications for targeting of therapeutic genes to the inflamed joint // Arthritis Rheum. — 2001. — Vol. 44. — P. 1540—1544.
25. **Hu S., Sheng W.S., Peterson P.K., Chao C.C.** Differential regulation by cytokines of production of nitric oxide by human astrocytes // Glia. — 1995. — Vol. 15. — P. 491—494.
26. **Iyer N.V.** et al. Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  // Genes Dev. — 1998. — Vol. 12. — P. 149—162.
27. **Jantsch J.** et al. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function // J. Immunol. — 2008. — Vol. 180. — P. 4697—4705.
28. **Kamogawa Y., Minasi L.A., Carding S.R.** et al. The relationship of IL-4- and IFN- $\gamma$ -producing T cells studied by lineage ablation of IL-4-producing cells // Cell. — 1993. — Vol. 75. — P. 985.
29. **Kontinen Y.T.** et al. Disease-associated increased HIF-1,  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin, and Flt-1 do not suffice to compensate the damage-inducing loss of blood vessels in inflammatory myopathies // Rheumatol. Int. — 2004. — Vol. 24. — P. 333—339.
30. **Knieriem H.J., Jurukova Z.** Proteolytic enzyme release by macrophages in the destabilisation process of atherosclerotic plaques // Atherosclerosis. — 1997. — Vol. 134. — P. 233.
31. **Kruger B., Krick S., Dhillon N.** et al. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2009. — Vol. 106. — P. 3390—3395.
32. **Kuhlicke J., Frick J.S., Morote Garcia J.C.** et al. Hypoxia inducible factor (HIF). 1 coordinates induction of Toll-like receptors TLR2 and TLR6 during hypoxia // PLoS-ONE. — 2007. — Vol. 2. — P. 1364.
33. **Lewis J.S., Landers R.J., Harris A.L., Lewis C.E.** Expression of vascular endothelial growth factor is upregulated by macrophages in poorly vascularised areas of breast carcinomas // J. Pathol. — 1999. — Vol. 189 (Suppl.). — 13A.
34. **Lewis J.S., Lee J.A., Underwood J.C.E.** et al. Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms // Journal of Leukocyte Biology. — 1999. — Vol. 66. — P. 889—900.

35. *Lo C.J., Cryer H.G., Fu M.J., Lo F.R.* Regulation of macrophage eicosanoid generation is dependent on nuclear factor kappa B // *J. Trauma.* — 1998. — Vol. 45. — P. 19–23.
36. *Mach B., Steimle V., Martinez-Soria E., Reith W.* // *Ann. Rev. Immunol.* — 1996. — Vol. 14. — P. 301–331.
37. *Mantovani A., Sica A., Locati A.* New vistas on macrophage differentiation and activation // *Europ. J. Immunol.* — 2006. — Vol. 37(1). — P. 14–16.
38. *Martinez F.O., Gordon S., Locati A., Mantovani A.* Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression // *J. Immunol.* — 2006. — Vol. 177. — P. 7303–7311.
39. *Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M.* Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* — 2008. — Vol. 1(13). — P. 453–461.
40. *Marui N., Offermann M.K., Swerlick R.* et al. // *J. Clin. Invest.* — 1993. — Vol. 92. — P. 1866–1874.
41. *Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M.* et al. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm // *The Journal of Immunology.* — 2000. — Vol. 164. — P. 6166–6173.
42. *Nizet V., Johnson R.S.* Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nature Reviews // Immunology.* — 2009. — Vol. 9. — P. 609–617.
43. *Ozawa K., Kuwabara K., Tamatani M.* et al. 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) suppresses hypoxia-induced apoptotic cell death // *J. Biol. Chem.* — 1999. — Vol. 274(10). — P. 6397–6404.
44. *Paul W.E., Seder R.A.* Lymphocyte responses and cytokines // *Cell.* — 1994. — Vol. 76. — P. 241–251.
45. *Rosenberger P., Schwab J.M., Mirakaj V.* et al. Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia // *Nat. Immunol.* — 2009. — Vol. 10. — P. 195–202.
46. *Ryan H.E., Lo J., Johnson R.S.* HIF-1 $\alpha$  is required for solid tumor formation and embryonic vascularization // *EMBO J.* — 1998. — Vol. 17. — P. 3005–3015.
47. *Scannell G.* Leukocyte responses to hypoxic/ischemic conditions // *N. Horiz.* — 1996. — Vol. 4. — P. 179–183.
48. *Semenza G.L.* Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 // *Physiology (Bethesda).* — 2009. — Vol. 24. — P. 97–106.
49. *Shih S., Claffey K.P.* Hypoxia-mediated regulation of gene expression in mammalian cells // *Int. J. Exp. Pathol.* — 1998. — Vol. 79. — P. 347–357.
50. *Sica A., Mantovani A., Locati M.* Macrophage activation and polarization // *Front Biosci.* — 2008. — Vol. 1(13). — P. 453–461.
51. *Sieling P.A., Abrams J.S., Yamamura M.* et al. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. In vitro modulation of T cell responses in leprosy // *J. Immunol.* — 1993. — Vol. 150(12). — P. 5501–5510.
52. *Sharma M.* Chemokines and their receptors: orchestrating a fine balance between health and disease // *Critical Reviews in biotechnology.* — 2009. — P. 1–22.
53. *Simanonek J.P.* Non-ishaemic hypoxia of the arterial wall is a primary cause of atherosclerosis // *Med. Hypoth.* — 1996. — Vol. 46. — P. 155–161.
54. *Thompson L.F., Eltzschig H.K., Ibla J.C.* et al. Crucial role for ecto-5 $\alpha$ -nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia // *J. Exp. Med.* — 2004. — Vol. 200. — P. 1395–40511.
55. *Tumitan A.R., Monnazzi L.G., Ghiraldi F.R.* et al. Pattern of macrophage activation in yersinia-resistant and yersinia-susceptible strains of mice // *Microbiol. Immunol.* — 2007. — Vol. 51(10). — P. 1021–1028.
56. *Vink A.* et al. HIF-1 $\alpha$  expression is associated with an atheromatous inflammatory plaque phenotype and upregulated in activated macrophages // *Atherosclerosis.* — 2007. — Vol. 195. — P. 69–75.
57. *Ye J.* Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance // *Int. J. Obes. (Lond.).* — 2009. — Vol. 33. — P. 54–66.
58. *Yun J.K., McCormick T.S., Villabona C.* et al. Inflammatory mediators are perpetuated in macrophages resistant to apoptosis induced by hypoxia // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1997. — Vol. 94(25). — P. 13903–13908.

Поступила 21.03.12

#### Сведения об авторах:

*Круглов Сергей Васильевич*, канд. биол. наук, вед. научн. сотр. лаб. клеточных биотехнологий, ГБОУ ВПО «МГМСУ» Минздравсоцразвития РФ, старш. науч. сотр., лаб. стресса и адаптации ФГБУ «НИИОПП» РАМН

*Лямина Светлана Владимировна*, канд. мед. наук, старш. научн. сотр. лаб. клеточных биотехнологий, ассистент каф. факультетской терапии и профболезней ГБОУ ВПО «МГМСУ» Минздравсоцразвития РФ

© Ю.И. Кирова, 2012  
УДК 616.152.21:616.831.31:616-003.96:599.323.4

Ю.И. Кирова

## **Влияние гипоксии на динамику содержания HIF-1 $\alpha$ в коре головного мозга и формирование адаптации у крыс с различной резистентностью к гипоксии**

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

Гипоксические воздействия в режиме прекодиционирования вызывают в коре головного мозга неустойчивых к гипоксии крыс фазное увеличение экспрессии HIF-1. Показано, что после каждого гипоксического воздействия наблюдается кратковременная фаза срочной экспрессии HIF-1, которая быстро нивелируется в нормоксических условиях. Вторичное увеличение экспрессии HIF-1 развивается через сутки после очередного гипоксического воздействия. Фазность срочной и долгосрочной экспрессии HIF-1 коррелирует с динамикой формирования у неустойчивых к гипоксии крыс срочной и отсроченной резистентности, что позволяет предполагать вовлеченность HIF-1 в механизмы не только долговременной, но и срочной адаптации к гипоксии. У высокоустойчивых животных гипоксические воздействия в режиме прекодиционирования не влияют на экспрессию HIF-1 и формирование адаптации. Тяжелая гипоксия вызывает у двух фенотипов животных подавление экспрессии HIF-1, снижение способности к формированию срочной резистентности и нарушение индукции долговременной адаптации.

**Ключевые слова:** HIF-1 $\alpha$ , неокортекс, гипоксия, высокоустойчивые и неустойчивые к гипоксии крысы, срочная и долговременная адаптация к гипоксии

Yu.I. Kirova

## **Impact of hypoxia on dynamics of the post-hypoxia HIF-1 $\alpha$ level in neocortex and adaptation forming in rats with different resistance to hypoxia**

Institute of general pathology and pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

Hypoxic preconditioning induces two-phase increase of HIF-1 $\alpha$  expression in the neocortex of low-resistance rats. The first, brief phase appears after each hypoxic episode and rapidly disappears in normoxic conditions. The second increase in HIF-1 $\alpha$  expression occurs in 24 hours after the hypoxic episode. The phase-nature of HIF-1 $\alpha$  expression corresponds to the dynamics of urgent and long-term resistance in low-resistance rats, which suggests the HIF-1 $\alpha$  involvement in mechanisms of urgent and long-term adaptation. In high-resistance rats, hypoxia preconditioning does not influence the HIF-1 $\alpha$  protein expression and the adaptation. Severe hypoxia inhibits the HIF-1 $\alpha$  protein expression in the neocortex of both rat phenotypes, depresses the formation of urgent resistance, and abolishes the induction of long-term adaptation.

**Key words:** HIF-1 $\alpha$ , neocortex, hypoxia, high-resistance rats, low-resistance rats, urgent and long-term adaptation to hypoxia

Гипоксические воздействия инициируют активацию адаптивных механизмов как на клеточном, так и системном уровне. Главным молекулярным медиатором формирования долговременной адаптации является индуцируемый гипоксией транскрипционный фактор HIF-1 (hypoxia inducible factor). В настоящее время известно свыше 180 генов, экспрессия которых является HIF-зависимой. Гипоксический транскрипционный фактор координирует пролиферацию, дифферен-

цировку и клеточную выживаемость как на этапе эмбрионального развития, так и в постнатальном периоде. HIF-1 контролирует ангиогенез, эритропоэз, гликолиз, тонус сосудов [6—8].

HIF-1 — гетеродимерный белок, состоящий из двух субъединиц. Индуцибельная HIF-1 субъединица определяет транскрипционную активность и является кислород-регулируемой. В условиях нормоксии HIF-1 $\alpha$  подвергается деградации, инициируемой реакциями гидроксирования. Время ее полураспада в убиквитин-протеасомальной системе составляет не более 5 мин. В условиях гипоксии происходит подавление протеасомальной деградации, создаются усло-

**Для корреспонденции:** Кирова Юлия Игоревна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. биоэнергетики ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: bioenerg@mail.ru

вия для стабилизации HIF-1 $\alpha$ , транслокации из цитоплазмы в ядро, димеризации с конститутивно экспрессируемой HIF-1 $\beta$  субъединицей. Комплекс HIF-1 связывается с регуляторными последовательностями ДНК — HREs (hypoxia response element) и активирует транскрипцию генов-мишеней. Синтез HIF-1 $\alpha$ , в отличие от деградации, является кислород-независимым процессом, индуцируется факторами роста через тирозинкиназные рецепторы и активацию сигнальных путей MAPK и PI3K [7, 8].

В настоящее время накоплен огромный банк данных о роли HIF-1 в формировании генно-опосредованных ответов клеток на гипоксические воздействия. Однако подавляющее большинство исследований проведены на клеточных культурах и в условиях моделирования жесткой гипоксии (1—2% O<sub>2</sub>, многочасовые воздействия). В связи с этим неизученными остаются многие принципиальные вопросы, в том числе:

- 1) имеются ли различия в базовом содержании HIF-1 $\alpha$  у животных с разной чувствительностью к гипоксии;
- 2) какие режимы гипоксии являются оптимальными для экспрессии HIF-1 $\alpha$ ;
- 3) какова динамика содержания HIF-1 $\alpha$  при формировании срочной и долгосрочной адаптации к гипоксии;
- 4) какое значение имеет индивидуальная чувствительность к гипоксии в этих процессах.

Изучению этих вопросов была посвящена представленная работа.

### Методика

Работа проведена на двух фенотипах животных: неустойчивых (НУ) и высокоустойчивых (ВУ) к гипоксии белых беспородных крысах-самцах, содержащихся в виварии в стандартных условиях [3].

В течение 15 дней животных подвергали воздействию:

- а) интервальной нормобарической гипоксии (ИНГ) в режиме прекондиционирования (ежедневные часовые циклы, состоящие из чередования кратковременных (5 мин) периодов дыхания при постоянном нормальном давлении гипоксической газовой смесью, содержащей 10% O<sub>2</sub>, сменяющихся дыханием (3 мин) атмосферным воздухом);
- б) гипобарической гипоксии в режиме прекондиционирования — подъем в барокамере на высоту 5000 м, 10,5% O<sub>2</sub> и пребывание в этих условиях в течение часа, ГБГ-5000;
- в) тяжелой гипобарической гипоксии — подъем в барокамере на высоту 7000 м, 8% O<sub>2</sub> и пребывание в этих условиях в течение часа, ГБГ-7000.

Содержание HIF-1 $\alpha$  определяли в наиболее чувствительной к гипоксии ткани — коре головного мозга (КГМ). Забор ткани для определения HIF-1 $\alpha$  проводили сразу (1 мин) и через 24 ч после 1-го, 3-го, 8-го и 15-го применения гипоксических воздействий в выбранном режиме. В эти же периоды оценивали степень адаптированности крыс по изменению их общей резистентности (время жизни — ВЖ — в условиях острой гипобарической гипоксии на критической высоте).

Для определения содержания HIF-1 $\alpha$  [5] получали ядерный экстракт КГМ. Белки разделяли в 8% полиакриламидном геле (ПААГ). Перенос белков с ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли электроолюцией в течение 60 мин. Преинкубацию Вестерн-блотов проводили 60 мин в PBS, содержащем 0,5% Tween-20 и 5% обезжиренное молоко. Затем Вестерн-блоты инкубировали 14 ч при 4°C в растворе первичных поликлональных антител (Santa Cruz Biotechnology) против HIF-1 $\alpha$  в разведении 1:1000. После отмывки блоты инкубировали 60 мин в растворе вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (Santa Cruz Biotechnology) в разведении 1:5000. Детектирование HIF-1 $\alpha$  осуществляли в реакции с ECL-реагентами на пленку фирмы Kodak с последующей денситометрией в программе Adobe Photoshop.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «Statistica 6,0» с использованием критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия между группами при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

*Базовое содержание HIF-1 $\alpha$  в КГМ крыс с разной исходной устойчивостью к гипоксии в нормоксических условиях различалось.* НУ крысы характеризовались более высоким уровнем HIF-1 $\alpha$ : он в 1,7 раза превышал содержание HIF-1 $\alpha$  в КГМ ВУ животных. Чем выше была толерантность крыс к гипоксии, тем ниже был базовый уровень HIF-1 $\alpha$  в КГМ (таблица). Выявленные различия в базовом содержании HIF-1 $\alpha$  в нормоксических условиях дополняют общую картину метаболических, регуляторных и функциональных отличий, характеризующих два крайних фенотипа животных по их устойчивости к гипоксии [2].

*Однократное гипоксическое воздействие в режиме прекондиционирования* (одночасовое применение ИНГ и ГБГ-5000) сопровождалось увеличением содержания HIF-1 $\alpha$  в неокортексе НУ животных. Оно было максимальным в первую минуту постгипоксического периода (120—140%) (рис. 1) и являлось, по-видимому, результатом аккумуляции HIF-1 $\alpha$  во время гипоксического воздействия, вы-

Базовое нормоксическое содержание HIF-1 $\alpha$  в неокортексе крыс с индивидуальными различиями в устойчивости к острой гипоксии (% к содержанию HIF-1 $\alpha$  у наиболее резистентных животных)

Время жизни (11 500 м), мин, с	0'40"	1'20"	2'20"	4'20"	8'40"
HIF-1 $\alpha$ , %	173*	174*	158*	116	100

Примечание. \* —  $p < 0,05$

званной подавлением в этих условиях его кислород-зависимой протеасомальной деградации. В следующие несколько часов постгипоксического периода происходила нормализация уровня HIF-1 $\alpha$  в КГМ, которая сменялась через 24 ч вторичным его увеличением. Последнее могло отражать активацию его кислород-независимого синтеза.

Таким образом, при достаточно мягких режимах гипоксических воздействий в ранний постгипоксический период (1-е сутки) в КГМ НУ крыс наблюдалась активация экспрессии HIF-1 $\alpha$ , которая носила двухфазный характер.

У ВУ крыс, в отличие от НУ, однократное часовое воздействие гипоксии в режиме прекондиционирования не влияло на уровень HIF-1 $\alpha$  в КГМ в первые сутки постгипоксического периода (рис. 1), что говорит о принципиальных отличиях в его экспрессии у данного фенотипа животных.

Однократное применение тяжелой формы гипоксии (ГБГ-7000) приводило у обоих фенотипов животных не к увеличению, а первичному достоверному снижению уровня HIF-1 $\alpha$  в КГМ в ранний постгипоксический период, которое могло достигать 30—40% (рис. 1), что может быть связано с нарастающим в этих условиях энергодефицитом и подавлением синтеза HIF-1 $\alpha$  на этапе трансляции [4]. Снижение экспрессии HIF-1 $\alpha$  в условиях тяжелой гипоксии наблюдали и другие исследователи [9]. В последующие часы происходила его постепенная нормализация вплоть до полного восстановления исходного уровня через сутки.

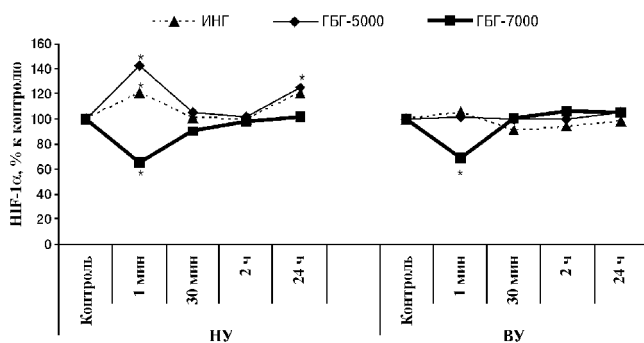


Рис. 1. Динамика содержания HIF-1 $\alpha$  в неокортексе НУ и ВУ крыс в первые сутки постгипоксического периода

При многократном (курсовом) применении гипоксии в режиме прекондиционирования (ИНГ, ГБГ-5000) каждое очередное гипоксическое воздействие приводило, как и в случае однократного применения, к кратковременному увеличению содержания HIF-1 $\alpha$  в КГМ, наблюдаемому сразу по окончании воздействия (через 1 мин), после чего оно снижалось, но оставалось выше того уровня, который предшествовал данному воздействию. Эффект усиления срочной и отсроченной экспрессии возрастал по мере увеличения числа гипоксических воздействий до 3—8. После 15-го гипоксического воздействия она возвращалась к исходным (до адаптации) значениям (рис. 2), что отражало, по-видимому, завершение формирования адаптации.

У ВУ крыс, в отличие от НУ, курсовые гипоксические воздействия в режиме прекондиционирования не влияли на уровень HIF-1 $\alpha$  в КГМ.

При курсовом применении тяжелой гипоксии (ГБГ-7000) срочная индукция HIF-1 $\alpha$ , наблюдаемая через минуты после окончания гипоксического воздействия и характерная для прекондиционирования, отсутствовала. Более того, каждое очередное гипоксическое воздействие сопровождалось примерно одинаковым (25—30%) снижением содержания HIF-1 $\alpha$  в КГМ НУ крыс в раннем постгипоксическом периоде (рис. 3). Через 1 сут. после первых трех гипоксических воздействий наблюдалась нормализация уровня HIF-1 $\alpha$ . Однако при увеличении количества воздействий ГБГ-7000 до 8—15 этого не происходило и содержание HIF-1 $\alpha$

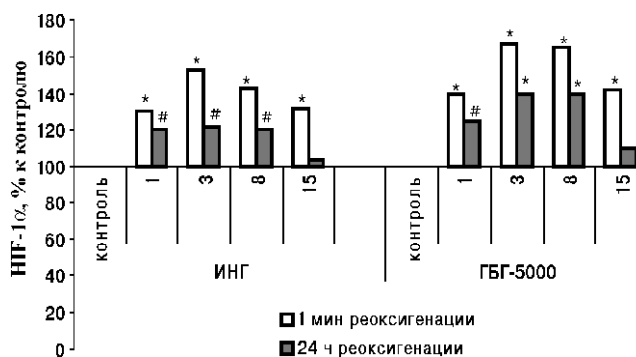


Рис. 2. Динамика содержания HIF-1 $\alpha$  в неокортексе НУ крыс при курсовом применении гипоксии в режиме прекондиционирования

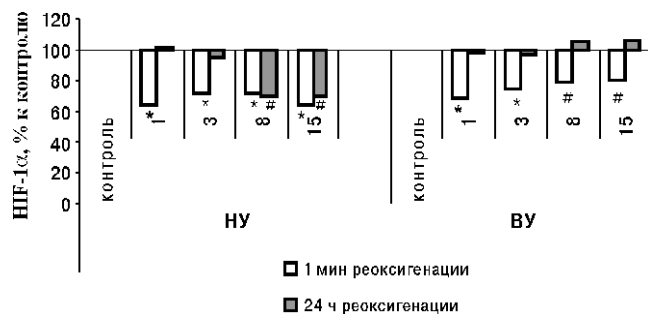


Рис. 3. Динамика содержания HIF-1α в неокортексе НУ и ВУ крыс при курсовом применении тяжелой гипоксии

оставалось устойчиво сниженным через 24 ч после гипоксического воздействия (рис. 3).

У ВУ крыс тяжелая гипоксия, как и в случае с НУ животными, приводила к снижению содержания HIF-1α в КГМ на 20—25%, наблюдаемом сразу после окончания каждого гипоксического воздействия, однако через сутки отмечалась нормализация уровня HIF-1α независимо от числа гипоксических предъявлений (рис. 3).

В связи с полученными данными возникает вопрос, имеется ли связь между наблюдаемыми особенностями экспрессии HIF-1α в ответ на гипоксические воздействия и индивидуальной чувствительностью животных к гипоксии, а также способностью к формированию у них срочной и долгосрочной резистентности, являющихся показателями адаптации.

Известно, что формирование срочной и долгосрочной резистентности происходит только у НУ животных [1, 3]. Нами также было показано, что любое однократное гипоксическое воздействие в режиме прекондиционирования (ИНГ, ГБГ-5000) индуцировало двухфазное увеличение резистентности животных: сразу после окончания гипоксии (срочная резистентность) и через 24 ч (отсроченная резистентность) (рис. 4). Для срочной резистентности было характерно многократное увеличение толерантности НУ крыс к острой гипоксии (в 3—9 раз). Вторичное, отсроченное увеличение толерантности было существенно меньшим (в 1,5—2 раза) и развивалось после периода ее относительной нормализации (рис. 4). Эта фазность полностью совпадала с описанными выше фазными изменениями содержания HIF-1α в 1-е сутки после гипоксического воздействия.

При курсовом применении гипоксических воздействий в режиме прекондиционирования динамика формирования отсроченной резистентности у НУ животных также коррелировала с изменениями содержания HIF-1α в КГМ через 1 сут. после очередного гипоксического воздействия. При увеличении числа воздей-

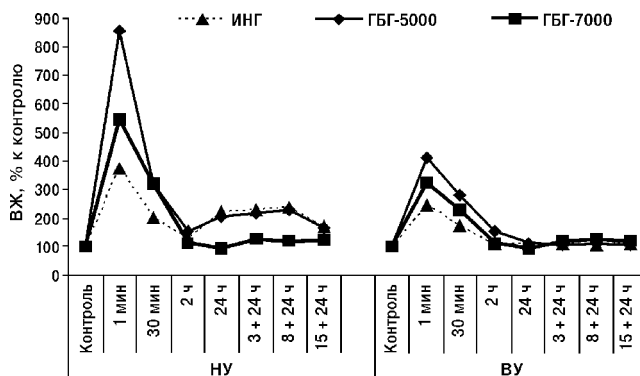


Рис. 4. Динамика резистентности НУ и ВУ крыс в постгипоксическом периоде при курсовом применении разных режимов гипоксии

вий до 8 резистентность нарастала и превышала исходную в 2—2,5 раза. Однако она снижалась после 15-го воздействия, что, видимо, отражало завершение формирования адаптации. Тем не менее, резистентность превышала контрольный уровень в 1,5—2,0 раза (рис. 4).

При курсовом применении тяжелой формы гипоксии (ГБГ-7000) у НУ крыс наблюдалась сниженная, в сравнении с прекондиционированием (ГБГ-5000), индукция срочной резистентности на фоне снижения экспрессии HIF-1α в КГМ в ранний постгипоксический период. Способность к формированию отсроченной резистентности также резко снижалась, а фаза вторичного (через 24 ч) увеличения уровня HIF-1α вообще отсутствовала. Последнее позволяет предполагать нарушение кислород-независимого синтеза HIF-1α в этих условиях.

У ВУ животных степень выраженности срочной резистентности была значимо меньше, в сравнении с НУ. Отсроченная резистентность у них вообще не формировалась (рис. 4).

Таким образом, представленные данные позволяют сделать следующие выводы:

1. Гипоксические воздействия в режиме прекондиционирования (до 10% O<sub>2</sub>) индуцируют у НУ животных фазное увеличение экспрессии HIF-1α в КГМ на фоне такого же фазного формирования срочной и долговременной адаптации к гипоксии. У ВУ животных гипоксические воздействия в режиме прекондиционирования не влияют на экспрессию HIF-1α в КГМ и формирование адаптации;

2. Тяжелая гипоксия (не более 8% O<sub>2</sub>) вызывает как у НУ, так и ВУ крыс однонаправленную реакцию подавления срочной экспрессии HIF-1α в КГМ и снижение способности к формированию срочной резистентности к гипоксии. В условиях тяжелой гипоксии долговременная адаптация не формируется у обоих фенотипов животных.

## Список литературы

1. Лукьянова Л.Д., Германова Э.Л., Копаладзе Р.А. Закономерности формирования резистентности организма при разных режимах гипоксического preconditionирования: роль гипоксического периода и реоксигенации // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2009. — Т. 147, №4. — С. 380—384.
2. Лукьянова Л.Д. Функционально-метаболические особенности животных с различной индивидуальной резистентностью к гипоксии // Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты / Ред. Л.Д. Лукьянова, И.Б. Ушаков. — М.; Воронеж: Истоки, 2004. — С. 156—170.
3. Чернобаева Г.Н., Лукьянова Л.Д. Роль индивидуальной резистентности к гипоксическому фактору при поиске антигипоксантов и оценке эффективности их действия // Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. — М., 1989. — С. 160—164.
4. Althausen S., Mengesdorf T., Mies G. et al. Changes in the phosphorylation of initiation factor eIF-2alpha, elongation factor eEF-2 and p70 S6 kinase after transient focal cerebral ischaemia in mice // J. Neurochem. — 2001. — №78. — P. 779—787.
5. Calvert J.W., Cahill J., Yamaguchi-Okada M., Zhang J.H. Oxygen treatment after experimental hypoxia-ischemia in neonatal rats alters the expression of HIF-1 $\alpha$  and its downstream target genes // J. Appl. Physiol. — 2006. — №101. — P. 853—865.
6. Semenza G.L., Wang G.L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation // Mol. Cell. Biol. — 1992. — №12. — P. 5447—5454.
7. Semenza G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy // Cancer. — 2003. — №3. — P. 721—732.
8. Semenza G.L. Regulation of Oxygen Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1 // Physiology. — 2009. — №24. — P. 97—106.
9. Stroka D.M., Burkhardt T., Desbaillets I. et al. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia // The FASEB Journal. — 2001. — №15. — P. 2445—2453.

Поступила 27.04.12

С.В. Круглов<sup>1,2</sup>, Л.Ю. Бахтина, С.В. Калиш<sup>1,3</sup>, Е.В. Малышева<sup>1</sup>,  
О.П. Буданова<sup>2</sup>, Е.Б. Манухина<sup>2</sup>, Н.П. Ларионов<sup>3</sup>, И.Ю. Малышев<sup>1,2</sup>

## **Устойчивость к острой гипоксии и изменение фенотипа и фенотипической пластичности макрофагов мышей разных генетических линий**

<sup>1</sup> Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико-стоматологический университет» Министерства здравоохранения и социального развития РФ, Россия, Москва, ул. Делегатская, 20/1

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

<sup>3</sup> Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Владимирский государственный университет им. Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых», Россия, Владимир, 600000, ул. Горького, 87

*Цель работы — изучение влияния гипоксии на фенотип и фенотипическую пластичность макрофагов, и определение устойчивости к острой гипоксии мышей линии C57/BL, имеющих провоспалительный M1 фенотип макрофагов и мышей BALB/c, имеющих противовоспалительный M2 фенотип макрофагов. Показано, что: 1) реакция макрофагов на острую гипоксию имеет две последовательные фазы: срочную противовоспалительную и отдаленную провоспалительную. При этом в M1 макрофагах C57/BL6 эта реакция имела более выраженный инвертированный характер, чем в M2 макрофагах BALB/c; 2) влияние острой гипоксии на фенотипическую пластичность макрофагов зависит от генетически детерминированного исходного фенотипа макрофагов. При этом наблюдается четкая закономерность: после острой гипоксии увеличивается способность макрофагов сдвигаться в сторону провоспалительного M1 фенотипа, а в сторону противовоспалительного M2 фенотипа практически не изменяется; 3) мыши линии BALB/c более устойчивы к острой гипоксии, по сравнению с C57/BL6. В совокупности эти данные расширяют представления о механизмах патогенетического действия гипоксии.*

**Ключевые слова:** гипоксия, макрофаги, пластичность иммунного ответа

S.V. Kruglov<sup>1,3</sup>, L.Yu. Bahtina<sup>2</sup>, S.V. Kalish<sup>1,3</sup>, E.V. Malysheva<sup>1</sup>, O.P. Budanova<sup>2</sup>,  
E.B. Manukhina<sup>3</sup>, N.P. Larionov<sup>2</sup>, I.Yu. Malyshev<sup>1,3</sup>

## **Resistance to acute hypoxia and changes in the phenotype and phenotypic plasticity of macrophages from mice of different genetic strains**

<sup>1</sup> Moscow State University of Medicine and Dentistry, 20/1, Delegatskay str., Moscow, 127473, Russia

<sup>2</sup> The Alexander Grigorievich and Nikolay Grogorievich Stoletov Vladimir State University, Vladimir, 87, Gorkiy str., Vladimir, 600000, Russia

<sup>3</sup> Institute of general pathology and pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

*The aim of study was to investigate the effect of hypoxia on the macrophage phenotype and phenotypic plasticity and to determine the resistance to acute hypoxia in C57/BL mice, which have the pro-inflammatory M1 macrophage phenotype, and in BALB/c mice, which have the anti-inflammatory M2 macrophage phenotype. The following results were obtained. 1) The response of macrophages to acute hypoxia has two successive phases, the immediate, anti-inflammatory phase, and the delayed, pro-inflammatory phase. This response was more distinctly inverted in C57/BL6 M1 macrophages than in BALB/c M2 macrophages; 2) the effect of acute hypoxia on macrophage phenotypic plasticity depends on the genetically predetermined, original macrophage phenotype. In this process, a clear regularity was observed: hypoxia increased the capability of macrophages for changing into the pro-inflammatory M1 phenotype, while their capability for changing into the anti-inflammatory M2 phenotype remained virtually unaffected. 3) BALB/c mice were more resistant to acute hypoxia than C57/BL6 mice. Taken together, these data expand our understanding of mechanisms for pathogenetic effects of hypoxia.*

**Key words:** hypoxia, macrophages, immune response plasticity



Гипоксия в тканях и клетках организма часто является звеном патогенеза разных заболеваний. Гипоксия может быть обусловлена недостатком кислорода в воздухе, нарушением транспорта кислорода к клеткам, а также сопутствовать различным патологическим процессам [5, 6, 7, 10, 20, 21]. Патогенетическое действие гипоксии может быть связано с влиянием на иммунные реакции. Показано, например, что гипоксия в трансплантатах отягощает воспалительный процесс, способствуя их отторжению [4, 11]. При ожирении, возникающая в ответ на гипоксию инфильтрация жировой ткани макрофагами способствует развитию инсулинорезистентности [23]. Скопление макрофагов в областях гипоксии [8, 12, 13] является ключевым моментом в понимании механизмов влияния гипоксии на иммунитет.

В зависимости от микроокружения, макрофаг может менять свой фенотип с провоспалительного (M1) на противовоспалительный (M2), и наоборот [19]. Макрофаг с фенотипом M1 имеет округлую форму и продуцирует большое количество NO, активных форм кислорода (АФК) [15] и провоспалительных цитокинов, таких, как IL-12 и TNF- $\alpha$  [14]. M1 макрофаги способствуют развитию клеточного Th1 иммунного ответа, который уничтожает бактерии, вирусы и опухолевые клетки [19]. Макрофаг с M2 фенотипом имеет фибробластоподобную форму и продуцирует меньше АФК и NO, чем M1, но секретирует много противовоспалительных цитокинов, таких, как IL-10, IL-13 и TGF- $\beta$  [14]. M2 макрофаги способствуют развитию гуморального Th2 иммунного ответа, который обезвреживает экстраклеточных паразитов и токсины. M2 клетки также регулируют воспаление, ремоделирование и репарацию тканей, и способствуют ангиогенезу и опухолевому росту [16].

Процесс смены фенотипа клетки получил название — «репрограммирование». Феномен репрограммирования фенотипа макрофагов обеспечивает пластичность иммунного ответа, т.е. способность менять направление иммунных реакций с целью эффективного ответа на проникновение инфекции или изменения окружающей среды.

Представления о макрофаге как о клетке с фенотипической пластичностью, породили важные вопросы, имеющие отношение к нарушению иммунного ответа при гипоксии.

#### Цель работы:

- 1) изучение влияния гипоксии на фенотип и фенотипическую пластичность макрофагов;
- 2) оценка влияния фенотипа макрофагов и детерминируемого им типа иммунного ответа на устойчивость организма к гипоксии.

#### Методика

Эксперименты проводили на 3-месячных мышах линий C57/BL6 и Balb/c. Макрофаги мышей C57/BL6 имеют M1 фенотип, тогда как Balb/c — M2 фенотип [22].

Острую гипоксию создавали подъемом мышей в барокамере двумя способами:

- 1) на «высоту» 7000 м (8% O<sub>2</sub>) на 60 мин (7000/60) или
- 2) на «высоту» 9000 м (6,6% O<sub>2</sub>) на 20 мин (9000/20).

После острой гипоксии 7000/60 мыши выживали, и это позволяло оценить влияние острой гипоксии на фенотип и фенотипическую пластичность макрофагов. При острой гипоксии 9000/20 часть животных погибала, что позволяло сравнить устойчивость разных линий мышей к острой гипоксии [18].

Через 1 и 12 ч после острой гипоксии 7000/60 мышей наркотизировали эфиром, декапитуировали и затем из перитонеального смыва выделяли макрофаги. Взвесь макрофагов в среде RPMI-1640 размещали в лунки планшетов по 0,5 млн клеток в 0,5 мл среды. Через 12 ч для определения фенотипа макрофаги стимулировали липополисахаридом (ЛПС) (в дозе 500 нг/мл, в течение 24 ч). Маркерами фенотипа служили:

- 1) форма клеток;
- 2) продукция NO;
- 3) содержание индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS).

Продукцию NO оценивали по содержанию нитритов в культуральной среде с помощью реактива Грисса [9] и изменению оптической плотности при 540 нм на микропланшетном ридере (BioRad, США). Содержание iNOS оценивали с помощью Вестерн блот анализа с использованием первичных антител против iNOS (Stressgen, США). Детектирование блотов iNOS проводили на ChemiDoc™ XR System (Bio-Rad, США). Результаты представляли в виде относительных денситметрических единиц. С помощью световой микроскопии подсчитывали количество округлых макрофагов (M1 фенотип) на 100 клеток (2). О приобретении макрофагами M1 фенотипа свидетельствовала высокая продукция NO, увеличение содержания iNOS при стимуляции ЛПС и увеличение количества округлых макрофагов, а о приобретении M2 фенотипа, напротив — низкая продукция NO, снижение содержания iNOS и снижение количества округлых макрофагов [17].

Для определения фенотипической пластичности, количественно оценивали способность макрофагов менять фенотип в сторону M1 — под действием фактора репрограммирования макрофагов на M1 фенотип (ФРМ1) — в отсутствии стандартной бычьей сыворотки FBS (Fetus Bovine Serum, 0% FBS), и в сторо-

ну M2 под действием ФРМ2 — 40% FBS. Контролем служили макрофаги, которые культивировали при нормальной концентрации FBS — 10% (ФРМ0). Через 12 часов репрограммирования для активации макрофагов добавляли ЛПС, 500 нг/мл на 24 ч.

Фенотипическую пластичность оценивали по трем показателям:

1) способности макрофагов менять фенотип с исходного в сторону M1 (Фенотипическая Пластичность M1, ФП-M1) — как процент изменения маркеров фенотипа при действии ФРМ1 (0% FBS);

2) способности макрофагов менять фенотип с исходного в сторону M2 (ФП-M2) — как процент изменения маркеров фенотипа при действии ФРМ2 (40% FBS);

3) суммарному диапазону изменений фенотипа макрофагов как (ФП-M1) + (ФП-M2).

Значения маркеров при нормальной 10%-ной концентрации FBS (ФРМ0) принимали за 100%.

Статистический анализ и вычисление критерия Стьюдента ( $p$ ) проводили в программе Statistica 8.0 (Statsoft). Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

### Влияние острой гипоксии на фенотип макрофагов

На рис. 1 представлены данные о влиянии острой гипоксии (7000/60) на фенотип макрофагов мышей C57/BL6 и BALB/c. Видно, что макрофаги контрольных мышей C57/BL6 продуцировали больше NO и имели более высокое содержание iNOS, по сравнению с макрофагами мышей BALB/c. Эти различия соответствуют данным литературы о том, что макрофаги мышей C57/BL6 имеют M1 фенотип, а BALB/c — M2 [22].

При определении фенотипа макрофагов через 1 ч после острой гипоксии, оказалось, что острая гипоксия практически не повлияла на фенотип макрофагов BALB/c (рис. 1А и Б), но существенно изменила фенотип макрофагов C57/BL6 в сторону M2 (рис. 1А). Так, после острой гипоксии продукция NO у макрофагов C57/BL6 была снижена более чем в 1,6 раза, по сравнению с контролем (рис. 1А). При этом количество округлых (M1 фенотип) C57/BL6 макрофагов также снизилось (рис. 1В).

Дальнейшие исследования показали, что реакция макрофагов на острую гипоксию является двухфазной. В отличие от первого часа, через 12 ч после острого гипоксического воздействия, и макрофаги BALB/c, и макрофаги C57/BL6 стали приобретать провоспалительный M1 фенотип. К этому времени продукция NO в макрофагах BALB/c и макрофагах C57/BL6 была увеличена в 1,75 и 1,23 раза соответственно (рис. 1А); количество округлых макрофагов

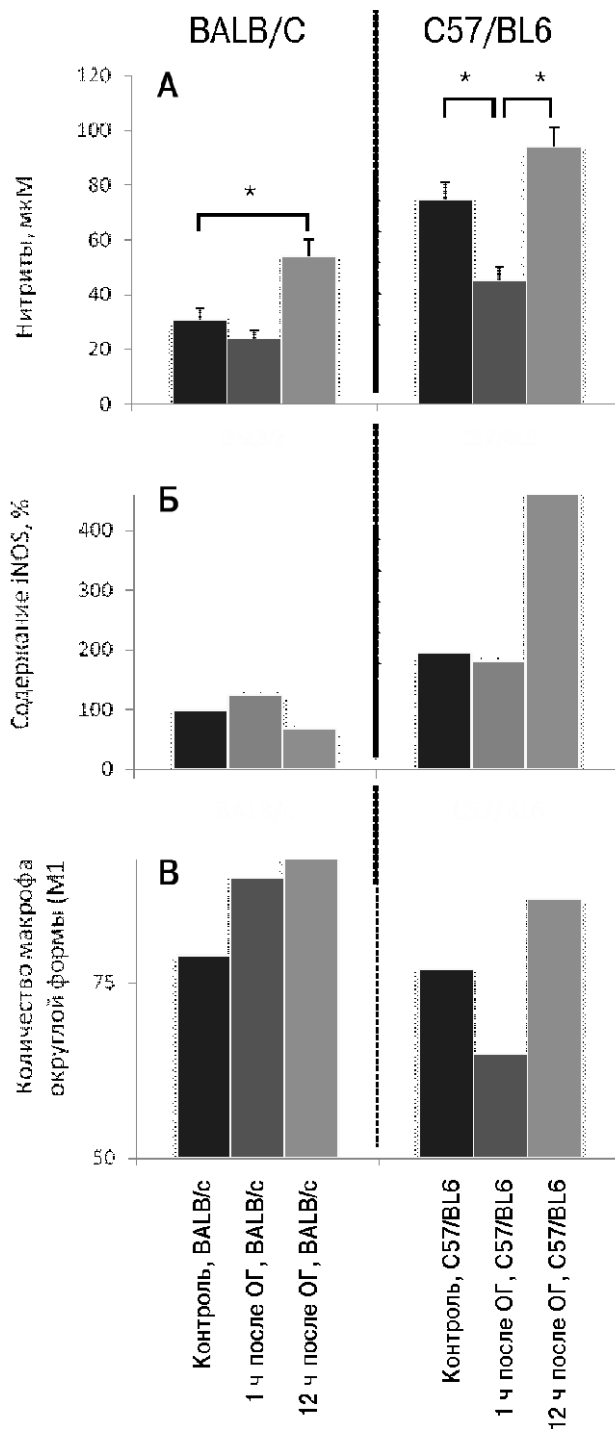


Рис. 1. Влияние предварительной острой гипоксии мышей линий BALB/c и C57/BL6 на продукцию NO (А), содержание iNOS (Б) и внешний вид (В), выделенных из этих мышей (через 1 и 12 ч) макрофагов и затем активированных в культуре клеток с помощью ЛПС. Б — за 100% принималось значение содержания iNOS в перитонеальных макрофагах мышей линии BALB/c не подвергавшихся гипоксии. В — за 100% принималось 100 проанализированных макрофагов. По горизонтали линии: контроль — макрофаги мышей, не подвергавшихся гипоксии, ОГ — макрофаги мышей при острой гипоксии 1 ч и 12 ч.

(M1) также было увеличено (рис. 1B); в макрофагах случае C57/BL6 — отмечено увеличение содержания iNOS в 2,8 раза (рис. 1B).

Таким образом, влияние острой гипоксии на фенотип макрофагов имеет четкий двухстадийный инвертированный характер. Первая стадия, через 1 ч после острой гипоксии — стадия смещения фенотипа в сторону противовоспалительного M2. В макрофагах BALB/c эта стадия не выражена, а в макрофагах C57/BL6 — выражена очень сильно. Вторая стадия, через 12 ч после острой гипоксии — стадия смещения фенотипа в сторону провоспалительного M1 фенотипа. На этой стадии в макрофагах C57/BL6, в отличие от BALB/c, происходит выраженное увеличение содержания iNOS.

#### Влияние острой гипоксии на пластичность макрофагов

Наши исследования показали, что макрофаги BALB/c и C57/BL6 имеют некоторые отличия в исходной фенотипической пластичности (рис. 2). Макрофаги разных линий практически не отличались по способности менять свой фенотип в сторону M2 фенотипа (ФП-M2), но отличались по способности менять свой фенотип в сторону M1 (ФП-M1). Так ФП-M1 для C57/BL6 составил 42%, тогда как для BALB/c — лишь 27% (рис. 2). В результате суммарный диапазон изменений фенотипа (ФП-M1)+(ФП-M2) у C57/BL6 был немного шире, по сравнению с BALB/c.

После острой гипоксии 7000/60 в макрофагах BALB/c происходило постепенное возрастание величины показателя ФП-M1: с 27% в контроле, до 37% через 1 ч и до 47% через 12 ч. При этом показатель ФП-M2 практически не менялся. В результате за 12 ч после гипоксии суммарный диапазон изменений фенотипа (ФП-M1)+(ФП-M2) у макрофагов BALB/c постепенно увеличился на 18% (83% — 65%) (рис. 2). После острой гипоксии в макрофагах C57/BL6 также происходило возрастание показателя ФП-M1, однако в отличие от BALB/c оно было куполообразным: 42% в контроле, 82% через 1 ч и 40% через 12 ч. При этом значение показателя ФП-M2 в макрофагах C57/BL6, постепенно возрастало с 35% в контроле, до 41% через 1 ч и до 45% через 12 ч. В результате после острой гипоксии изменение (ФП-M1)+(ФП-M2) у макрофагов C57/BL6 имело куполообразный характер (рис. 2).

Таким образом влияние острой гипоксии на фенотипическую пластичность характеризуется увеличением способности макрофагов менять свой фенотип в сторону провоспалительного M1 (ФП-M1) и увеличением суммарного диапазона изменений фенотипа (ФП-M1)+(ФП-M2), или, другими словами, увеличением чувствительности макрофагов к факторам

среды. Эти изменения были зависимыми: в макрофагах BALB/c это увеличение носит постепенно-нарастающий характер, а в макрофагах C57/BL6 куполообразный. Влияние острой гипоксии на способность макрофагов менять свой фенотип в сторону противовоспалительного M2 (ФП-M2), также зависело от генетической линии мышей: в макрофагах BALB/c показатель ФП-M2 практически не изменялся, а в макрофагах C57/BL6 — постепенно возрастал.

#### Сравнение устойчивости к гипоксии мышей линии BALB/c и C57/BL6

Мы обнаружили, что мыши линии BALB/c и C57/BL6 обладают разной устойчивостью к острой гипоксии. Так, при подъеме мышей на высоту 9000 м в барокамере погибло 63% мышей линии C57/BL6 (n=38) и только 28% мышей линии BALB/c (n=38).

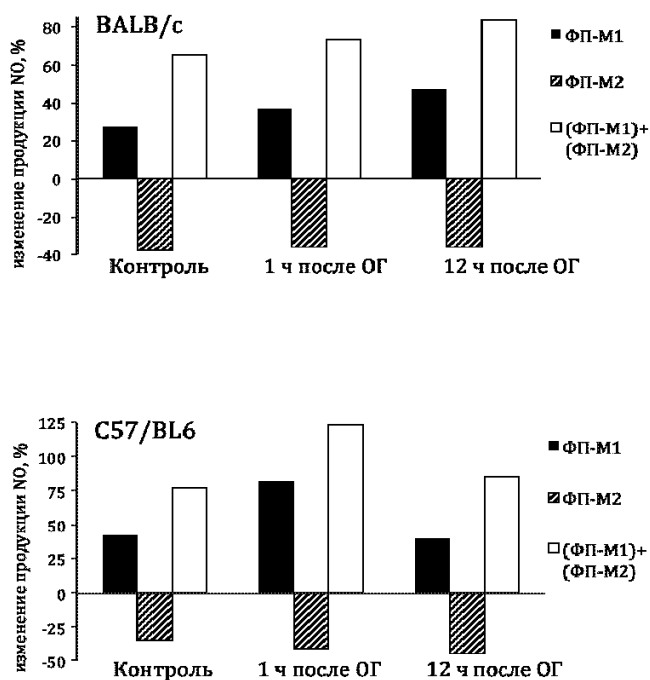


Рис. 2. Гистограммы фенотипической пластичности макрофагов мышей разных генетических линий (BALB/c и C57/BL6) в контроле и после 1 ч и 12 ч после острой гипоксии.

(ФП-M1) + (ФП-M2) — суммарная фенотипическая пластичность (белые столбцы)  
 ФП-M1 — фенотипическая пластичность в сторону M1 (черные столбцы)  
 ФП-M2 — фенотипическая пластичность в сторону M2 (штрихованные столбцы)  
 Цифры над столбиком обозначают изменение в процентах продукции NO (маркера фенотипа) при действии ФРМ

Таким образом, мыши BALB/c, имеющие M2 противовоспалительный фенотип макрофагов с более низкой фенотипической пластичностью в сторону провоспалительного M1, обладают большей устойчивостью к острой гипоксии, по сравнению с мышами C57/BL6, имеющими провоспалительный M1 фенотип макрофагов с более высокой фенотипической пластичностью в сторону провоспалительного M1.

Несколько фактов заслуживают обсуждения. Во-первых, тот факт, что реакция макрофагов на острую гипоксию имеет две фазы: срочную противовоспалительную (1-й час) и отдаленную провоспалительную (12-й час). При этом в M1 макрофагах мышей C57/BL6 эта реакция имела более выраженный инвертированный характер, чем в M2 макрофагах мышей BALB/c (рис. 1). В связи с этим возникает несколько вопросов. Почему в первый час после острой гипоксии макрофаги C57/BL6 (M1 фенотип) сильно трансформируют свой фенотип в сторону M2 фенотипа, а макрофаги BALB/c (M2 фенотип) лишь незначительно? И почему отдаленные (12 ч) последствия острой гипоксии проявляются провоспалительной реакцией макрофагов?

На сегодняшний день, известно большое количество факторов, которые могут менять фенотип макрофагов. Так, например, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  способны программировать макрофаги на M1 фенотип, тогда как IL-4 и IL-13 способствуют формированию M2 фенотипа [16]. Очевидно, что анализ перитонеальной жидкости, откуда выделялись макрофаги после острой гипоксии, мог бы помочь ответить на вопрос, какие из присутствующих там факторов могли бы программировать макрофаги.

Во-вторых, тот факт, что влияние острой гипоксии на фенотипическую пластичность макрофагов зависит от генетически детерминированного исходного фенотипа макрофагов. При этом наблюдается четкая закономерность: после острой гипоксии увеличивается способность макрофагов сдвигаться в сторону провоспалительного M1 фенотипа, а в сторону противовоспалительного M2 фенотипа эта способность практически не изменяется. Фенотипическая пластичность иммунных клеток играет ключевую роль в адекватном развитии иммунного ответа, и не исключено, что индуцированное острой гипоксией патологическое изменение фенотипа макрофагов в сторону M1 и увеличение фенотипической M1 пластичности может способствовать развитию заболеваний, сопровождающихся избыточной воспалительной реакцией.

Наконец, третий важный факт — мыши линии BALB/c и C57/BL6, имеющие разный фенотип иммунного ответа [22] имеют разную устойчивость к острой гипоксии. Ранее было показано, что разные популяции крыс также могут отличаться по своей

устойчивости к острой гипоксии [1, 3]. Здесь мы дополнительно показали, что иммунные реакции могут быть вовлечены в механизмы индивидуальной устойчивости организма к острой гипоксии.

Понять почему макрофаги BALB/c, имеющие M2 фенотип, более устойчивы к репрограммирующему действию острой гипоксии и почему мыши BALB/c более устойчивы к острой гипоксии, по сравнению с C57/BL6, могут помочь данные J.K. Yun et al. [24]. Эти авторы показали, что более устойчивые к гипоксии макрофаги имеют фибробластоподобную форму. Мы сегодня знаем, что такую форму имеют макрофаги M2 фенотипа. Поэтому мыши BALB/c, имеющие более устойчивый к гипоксии фенотип макрофагов и вероятно также и других клеток, имеют большую выживаемость при острой гипоксии, по сравнению с мышами линии C57/BL6, которые имеют M1 фенотип. Дополнительное объяснение, почему мыши BALB/c более устойчивы к острой гипоксии, чем C57/BL6, может быть получено при анализе фенотипической пластичности макрофагов. На рис. 2 видно, что первая реакция на острую гипоксию макрофагов BALB/c проявлялась возрастанием величины показателя ФП-M1 до 37%, тогда как макрофагов C57/BL6 — до 82%. Такое драматическое увеличение чувствительности макрофагов C57/BL6 к провоспалительным факторам и, соответственно, более выраженный воспалительный процесс, связанный с изменением активности макрофагов C57/BL6, мог обусловить более низкую устойчивость мышей C57/BL6 к острой гипоксии, по сравнению с BALB/c.

До сих пор нет исчерпывающего ответа на вопрос, через какие молекулярные механизмы острая гипоксия влияет на активность иммунных клеток и связаны ли различия в смертности мышей разных линий от острой гипоксии с различиями в фенотипе макрофагов. Однако мы уверены, что ответы на эти важные вопросы могут быть получены при изучении факторов транскрипции HIF-1, отвечающего за гипоксические реакции и NFkB, отвечающего за воспалительные реакции макрофагов.

## Список литературы

1. Лукьянова Л.Д. Биоэнергетическая гипоксия: понятие, механизмы и способы коррекции // Бюл. эксп. биол. и медицины. — 1997. — Т. 124, №9. — С. 244—254.
2. Лямина С.В., Круглов С.В., Веденикин Т.Ю., Борогодица О.А., Суворова И.А., Шимшелава Ш.Л., Малышев И.Ю. Альтернативное репрограммирование m1/m2 фенотипа перитонеальных макрофагов мышей *in vitro* с помощью интерферона гамма и интерлейкина 4 // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2011. — №4 (декабрь). — С. 235—242.

3. **Чернобаева Г.Н., Лукьянова Л.Д.** Роль индивидуальной резистентности к гипоксическому фактору при поиске антигипоксантов и оценке эффективности их действия // Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. — М., 1989. — С. 160—164.
4. **Andrade C.F., Kaneda H., Der S.** et al. Toll-like receptor and cytokine gene expression in the early phase of human lung transplantation // *J. Heart Lung Transplant.* — 2006. — Vol. 25. — P. 1317—1323.
5. **Arnold F., West D., Kumar S.** Wound healing: the effect of macrophage and tumour-derived angiogenesis on skin graft vascularisation // *Br. J. Exp. Pathol.* — 1987. — Vol. 68. — P. 569—574.
6. **Ayala A., Ertel W., Chaudry I.H.** Trauma-induced suppression of antigen presentation and expression of major histocompatibility class II complex in leukocytes // *Shock.* — 1995. — Vol. 5. — P. 79—90.
7. **Ertel W., Singh G., Morrison M.H.** et al. Chemically induced hypotension increases PGE2 release and depresses macrophage antigen presentation // *Am. J. Physiol.* — 1993. — Vol. 264. — R655—R660.
8. **Esser P., Heimann K., Wiedemann P.** Macrophages in proliferative vitreoretinopathy and proliferative diabetic-retinopathy-differentiation of subpopulations // *Br. J. Ophthalmol.* — 1993. — Vol. 77. — P. 731—733.
9. **Griess P.** Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselky und Benedikt Uebereinige Azoverbindungen // *Berichteder Deutschenchemischen Gesellschaft.* — 1879. — 12 (1). — P. 426—428.
10. **Hammes H.P., Lin J.H., Bretzel R.G.** et al. Upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor system in experimental background diabetic retinopathy of the rat // *Diabetes.* — 1998. — Vol. 47. — P. 401—406.
11. **Kruger B., Krick S., Dhillon N.** et al. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2009. — Vol. 106. — P. 3390—3395.
12. **Lewis J.S., Landers R.J., Harris A.L., Lewis C.E.** Expression of vascular endothelial growth factor is upregulated by macrophages in poorly vascularized areas of breast carcinomas // *J. Pathol.* — 1999. — Vol. 189 (Suppl.). — 13A.
13. **Lewis J.S., Lee J.A., Underwood J.C.E.** et al. Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms // *Journal of Leukocyte Biology.* — 1999. — Vol. 66. — P. 889—900.
14. **Mantovani A., Sica A., Locati A.** New vistas on macrophage differentiation and activation // *Europ. J. Immunol.* — 2006. — Vol. 37(1). — P. 14—16.
15. **Sica A., Mantovani A., Locati M.** Macrophage activation and polarization // *Front Biosci.* — 2008. — Vol. 1(13). — P. 453—461.
16. **Martínez F.O., Gordon S., Locati A., Mantovani A.** Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression // *J. Immunol.* — 2006. — Vol. 177. — P. 7303—7311.
17. **Martínez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M.** Macrophage activation and polarization // *Front Biosci.* — 2008. — 1(13). — P. 453—461.
18. **Shelley X.L. Zhang, I James J. Miller, David Gozal, Yang Wang.** Whole-body hypoxic preconditioning protects mice against acute hypoxia by improving lung function // *J. Appl. Physiol.* — 2004. — Vol. 96. — P. 392—397.
19. **Sica A., Mantovani A., Locati M.** New vistas on macrophage differentiation and activation. — 2007. — Vol. 37(1). — P. 14—16.
20. **Simanonok J.P.** Non-ishaemic hypoxia of the arterial wall is a primary cause of atherosclerosis // *Med. Hypoth.* — 1996. — Vol. 46. — P. 155—161.
21. **Thompson L.F., Eltzschig H.K., Ibla J.C.** et al. Crucial role for ecto-5y-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia // *J. Exp. Med.* — 2004. — Vol. 200. — P. 1395—40511.
22. **Tumitan A.R., Monnazzi L.G., Ghiraldi F.R.** et al. Pattern of macrophage activation in yersinia-resistant and yersinia-susceptible strains of mice // *MicrobiolImmunol.* — 2007. — Vol. 51(10). — P. 1021—1028.
23. **Ye J.** Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance // *Int. J. Obes. (Lond.).* — 2009. — Vol. 33. — P. 54—66.
24. **Yun J.K., McCormick T.S., Villabona C.** et al. Inflammatory mediators are perpetuated in macrophages resistant to apoptosis induced by hypoxia // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1997. — Vol. 94(25). — P. 13903—13908.

Поступила 03.05.12

### Сведения об авторах:

**Круглов Сергей Васильевич**, канд. биол. наук, вед. научн. сотр. лаб. клеточных биотехнологий ГБОУ ВПО «МГМСУ» Минздравсоцразвития РФ, старш. науч. сотр., лаб. стресса и адаптации ФГБУ «НИИОПП» РАМН  
**Калиш Сергей Валерьевич**, лаб. каф. патофизиологии ГБОУ ВПО «МГМСУ» Минздравсоцразвития РФ  
**Мальшева Елена Васильевна**, д-р мед. наук, проф. каф. патофизиологии ГБОУ ВПО «МГМСУ» Минздравсоцразвития РФ  
**Буданова Ольга Петровна**, старш. научн. сотр. лаб. стресса и адаптации ФГБУ «НИИОПП» РАМН  
**Манухина Евгения Борисовна**, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. регуляторных механизмов адаптации ФГБУ «НИИОПП» РАМН  
**Ларионов Николай Павлович**, д-р мед. наук, проф. ГБОУ ВПО «ВГУ»  
**Бахтина Лидия Юрьевна**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. стресса и адаптации ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Г.А. Романова, Ф.М. Шакова, Т.В. Давыдова

## **Сравнение нейропротективного действия антител к глутамату и лекарственного препарата семакса при очаговом ишемическом повреждении префронтальной коры головного мозга крыс**

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

Установлено, что при фокальной фотоиндуцируемой ишемии префронтальной коры головного мозга крыс семакс (*Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro*) и АТ-Глу (антитела к глутамату) при интраназальном введении проявляют выраженное нейропротективное и антиамнестическое действие. Интраназальное введение семакса (250 мкг/кг ежедневно в течение 6 суток) и АТ-Глу (250 мкг/кг через 1 ч после фототромбоза) вызывают уменьшение размера коркового инфаркта в коре головного мозга и способствуют сохранению и воспроизведению выработанного условного рефлекса пассивного избегания при проверке рефлекса на 8-й день после ишемического повреждения.

**Ключевые слова:** префронтальная кора головного мозга крыс, фотоиндуцируемый тромбоз, условный рефлекс пассивного избегания, амнезия, нейропротекция, антитела к глутамату (АТ-Глу), семакс

G.A. Romanova, F.M. Shakova, T.V. Davudova

## **The comparison of antiamnesic action of antibodies to glutamate and neuropeptide Semax in the focal ischemic damage of prefrontal cortex of rat brain**

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

It was stated, that with bilateral photochemically induced thrombosis of the prefrontal cortex peptide semax and the AB-Glu by intranasal injection provoke pronounced neuroprotective and antiamnesic action. Intranasal injection semax (250 mkg/kg/daily during six postoperative days) and AB-Glu (250 mkg/kg in 1 hour after phototrombosis) demonstrate diminishing of cortex damage volume and relieve preservation and reproduction rat passive avoidance reflex, acquired before bilateral photochemically induced thrombosis of prefrontal cortex.

**Key words:** bilateral photothrombosis, prefrontal cortex, peptide semax, AB-Glu, intranasal injection

Ишемия является наиболее распространенной причиной нарушений функций мозга [3]. Причем глобальная ишемия мозга встречается реже, чем фокальная церебральная ишемия при нарушении мозгового кровообращения в отдельном сосудистом бассейне (при ишемическом инсульте или транзиторной ишемической атаке). Передние префронтальные отделы неокортекса играют ключевую роль в процессе консолидации временной связи, в интегративной деятельности мозга, связанной с обучением и памятью [2, 6, 7]. Известно, что одним из ключевых механизмов при ишемических и травматических повреждениях мозга является нарушение глутаматергической нейротрансмиссии. Глутамат является основным возбуж-

дающим нейротрансмиттером в ЦНС, участвующим во многих процессах в мозге, включая когнитивные функции. Избыточное выделение глутамата при ишемических повреждениях мозга оказывает нейротоксическое действие, обуславливая из-за длительного притока кальция гибель кортикальных и субкортикальных нейронов [3].

Наиболее адекватной экспериментальной моделью, позволяющей избирательно исследовать когнитивные расстройства, является двустороннее локальное ишемическое повреждение префронтальной коры мозга крыс методом фототромбоза [16]. При быстро развивающейся недостаточности кровоснабжения в очаге ишемии, прежде всего в нейронах, возникают некробиотические повреждения, где наряду с простым цитолизом и острым набуханием можно выявить нейроны с гиперхроматозом и тяжелыми дест-

**Для корреспонденции:** Романова Галина Александровна, д-р биол. наук, проф., рук. лаб. ишемических повреждений мозга ФГБУ «НИИОПП РАМН». E-mail: romanovaga@mail.ru

руктивными процессами. В этот период в пограничной с некротическим очагом зоне (пенумбре), помимо отека, отмечаются изменения нейронов, где наряду с погибшими (ацидофильными) клетками присутствуют нормальные неизмененные нейроны, а также гиперхромные нейроны, которые на более поздних сроках либо восстанавливаются, либо погибают. Избыточное высвобождение и нарушение обратного захвата глутамата, ведущее к внутриклеточному накоплению кальция, действует эксайтотоксически и обуславливает гибель нейронов при ишемических повреждениях мозга.

Целью исследования было изучение образования Глу-АТ в сыворотке крови крыс при очаговом ишемическом повреждении префронтальной коры мозга и сравнение влияния интраназального введения Глу-АТ и нейропротектора семакса на сохранение условного рефлекса пассивного избегания, выработанного до ишемического повреждения коры.

### Методика

Все манипуляции с животными производили в соответствии с требованиями, сформулированными в Директивах Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований. Работа выполнена на 50 самцах беспородных крыс массой 200—250 г, выращенных в виварии ФГБУ Научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии РАМН. Животных содержали в виварии при свободном доступе к пище и воде и двенадцатичасовом световом режиме (освещение — с 7:00 до 19:00).

Двусторонний фокальный ишемический инфаркт префронтальной коры головного мозга крыс — поля Fr1 и Fr2 [13] создавали методом фотохимически индуцируемого тромбоза [16]. Операцию проводили под общим наркозом (хлоралгидрат в дозе 300 мг/кг, внутривенно). После введения фотосенсибилизируемого красителя бенгальского розового («Sigma», USA; 40 мг/кг, внутривенно) крысу фиксировали в стереотаксисе, делали продольный разрез кожи и удаляли надкостницу. Для облучения использовали специальную установку, состоящую из источника холодного света с галогеновой лампой мощностью 250 Вт, и световода с диаметром внутреннего сечения 3 мм. Световод устанавливали на расстоянии 1 мм от поверхности черепа на 2 мм роstralнее брегмы и на 2 мм латеральнее сагиттального шва и облучали холодным светом каждое из полушарий мозга в течение 20 мин. Ложнооперированных животных подвергали тем же процедурам, за исключением введения красителя бенгальского розового.

Все взятые в эксперимент животные были разделены на две серии. В первой серии (n=24) изучали образование антител к глутамату (Глу-АТ) в сыворотке крови после воспроизведения двустороннего ишемического инфаркта префронтальной коры головного мозга через 1 час, 4 и 8 сут. после операции.

Глу-АТ в сыворотке крови крыс определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) на полистироловых 96-луночных планшетах, сенсибилизированных тест-антигеном. В качестве тест-антигена использовали конъюгат глутамата с БСА (бычьим сывороточным альбумином), синтезированный модифицированным методом с помощью бифункционального реагента глутаральдегида [14]. Тест-антиген вносили в объеме 100 мкл в лунки планшета («Costar», USA) в конечной концентрации 0,3 мкг/лунка. Через 18 часов инкубации при 4°C планшеты 3—4 раза промывали физиологическим раствором с 0,05% Твином-20. Образцы сывороток инкубировали в течение 1 часа при 37°C в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,4) с 0,05% Твином-20 в объеме 100 мкл, используя 10-кратные разведения, начиная с разведения 1:10. После инкубации планшеты промывали и обрабатывали вторичными антителами к IgG крысы, меченные пероксидазой хрена, в разведении 1:2000. После часовой инкубации планшеты отмывали и в лунки добавляли по 100 мкл субстратной смеси, содержащей 10 мл 0,2 М раствора  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 10 мл 0,1 М раствора лимонной кислоты, 8 мг о-фенилдиамина («Sigma», USA), 8 мкл 33% раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$ . После часовой инкубации в темноте при комнатной температуре реакцию останавливали 6N.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Содержание антител в каждой лунке оценивали по оптической плотности сыворотки при  $\lambda=495$  нм с использованием считывающего устройства «Mini-reader» («Dynatech») и выражали в условных единицах активности — показателем, представляющим собой отношение оптической плотности сыворотки каждой крысы к среднему значению оптической плотности сывороток контрольных крыс. Если значение этого отношения превышало 1,0, делали вывод о наличии антител в сыворотках крови.

Глу-АТ получали от кроликов, иммунизированных по стандартной схеме конъюгатом глутамат-БСА [14]. Титр Глу-АТ, определяемый методом иммуноферментного анализа, составил 1:1000.  $\gamma$ -глобулиновые фракции из сывороток иммунизированных и интактных кроликов выделяли методом переосаждения сульфатом аммония, лиофилизировали и хранили при 4°C.

Во второй серии исследований было 5 групп:

- 1) ложнооперированные — ЛО (n=9);
- 2) крысы с двусторонним ишемическим инфарктом префронтальной коры головного мозга, которым

через 1 ч после операции, а далее ежедневно в течение 6 суток вводили интраназально по  $7 \times 2$  мкл дистиллированной воды — Иш +  $H_2O$  ( $n=9$ );

3) животные, которым через 1 ч после операции вводили интраназально водный раствор Глу-АТ в дозе 250 мкг/кг — Иш + Глу-АТ ( $n=9$ );

4) животные, которым в качестве контроля вводили водный раствор кроличьего  $\gamma$ -глобулина от интактных животных по той же схеме и в той же дозе — Иш +  $\gamma$ -ГЛ ( $n=7$ );

5) животные, которым вводили интраназально ежедневно в течение 6 суток семакс ( $7 \times 2$  мкл) в дозе 250 мкг/кг — Иш + семакс ( $n=7$ ). Введение семакса прекращали за двое суток до проверки сохранения УРПИ.

Всех животных проверяли на сохранение УРПИ через 8 суток после операции.

Оценку функционального состояния ЦНС крыс проводили по показателям латентного периода (ЛП с) условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ). Выработку УРПИ осуществляли по методике [2] в челночной камере отечественного производства Биотест РК-5201. УРПИ считали выработанным, если ЛП УРПИ составлял 300 с, животных с меньшими показателями исключали из эксперимента.

Объем очага повреждения коры фотоиндуцированным тромбозом определяли по формуле:

$$V = \Sigma(S_n d),$$

где:

$d$  — толщина пары срезов (200 мкм);

$S_n$  — измеренная площадь ишемического очага серийного среза ( $mm^2$ );

$\Sigma$  — сумма объемов ишемического повреждения.

#### Статистические методы обработки данных

Полученные данные обрабатывали при помощи пакета прикладных программ Statistica. Несколько групп сравнивали по одному признаку при помощи непараметрического метода сравнения независимых групп (метод Краскела—Уоллиса). Если этот анализ выявлял уровень значимости 0,05 или меньше, то парное сравнение между группами проводили, используя метод Манна—Уитни (сопоставление двух групп по одному или нескольким количественным признакам, имеющим хотя бы в одной из групп распределение, отличное от нормального). Различия в пределах каждой группы между дооперационными и послеоперационными показателями оценивали по парному Т-критерию Вилкоксона. Полученные данные представлены в виде  $M \pm m$ .

## Результаты и обсуждение

Использование фармакологических препаратов, оказывающих нейропротективное действие, способствует репаративным процессам в области пенумбры, снижает степень ишемического повреждения мозговой ткани и корректирует возникшие функциональные нарушения. Одним из механизмов иммунологической защиты от токсического действия глутамата на нейроны может быть образование антител к нему, вырабатывающихся в ответ на его избыточное высвобождение в ЦНС. В настоящее время показано образование антител к глутамату (Глу-АТ) при нейродегенеративных повреждениях головного мозга [4].

Ранее было показано, что фотохимически индуцируемый двусторонний тромбоз кровеносных сосудов в префронтальной области коры головного мозга крыс приводит к формированию ишемического очага (рис. 1), который захватывает всю толщину коры и отделен от окружающей неповрежденной ткани четко выраженной границей [6, 7].

При исследовании содержания Глу-АТ в сыворотках крови крыс с фокальным ишемическим очагом в префронтальной коре через 1 ч, на 4 и 8 сут. после фототромбоза по сравнению с ложноперирированными животными были выявлены существенные различия между группами (рис. 2). Через 1 ч после фототромбоза уровень Глу-АТ не отличался от контрольных ложноперирированных животных и сохранялся на этом уровне и на 4 сут. после операции. На 8 сут. в сыворотке крови крыс с двусторонним фототромбозом префронтальной коры резко возросло содержание Глу-АТ, что связано с реакцией иммунной системы на усиленную продукцию глутамата при развитии ишемического повреждения и проявляется повышенной выработкой антител.

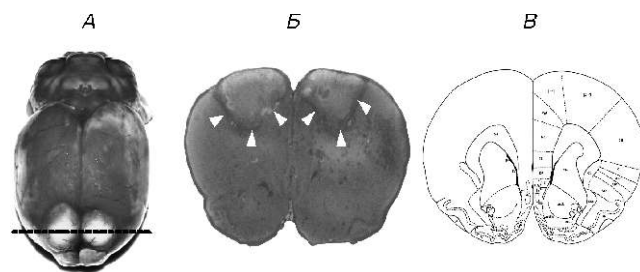


Рис. 1. Симметричные очаги ишемического повреждения префронтальной коры головного мозга крысы через 8 суток после фототромбоза:

А — окрашивание мозга трифенилтетразолия хлоридом; пунктирная линия показывает место среза, соответствующее приведенной схеме на рис. 1 В (2,2 мм от брегмы);

Б — окрашивание среза мозга крезилевым фиолетовым. Стрелки область очагов ишемии;

В — схема расположения префронтальной области мозга (поля Fr1 и Fr 2) согласно стереотаксическому атласу [13]



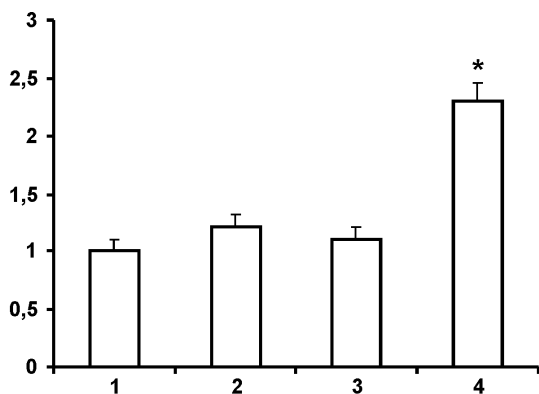


Рис. 2. Уровень Глу-АТ в сыворотке крови крыс (усл.ед.) при двустороннем фототромбозе префронтальной коры мозга крыс: 1 — ложнооперированные; 2 — через 1 ч после ишемического повреждения; 3 — на 4-е сутки после ишемического повреждения; 4 — на 8-е сутки после ишемического повреждения.  $P < 0,05$  по сравнению с ложнооперированными

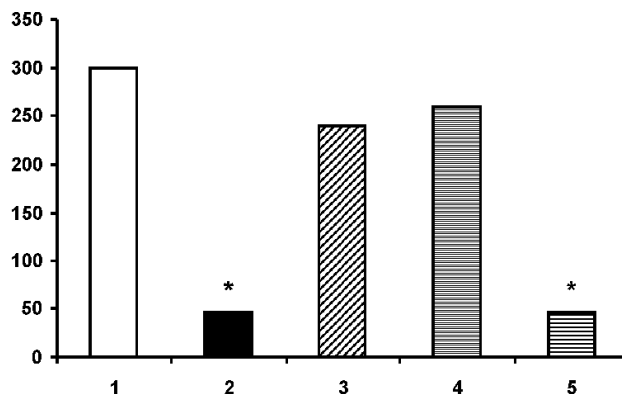


Рис. 3. Влияние интраназального введения АТ-Глу на сохранение УРПИ (с) у крыс с двусторонним фототромбозом префронтальной коры мозга: 1 — ложнооперированные; 2 — ишемическое повреждение; 3 — интраназальное введение семакса + ишемическое повреждение; 4 — интраназальное введение АТ — Глу + ишемическое повреждение; 5 — интраназальное введение гамма-глобулина + ишемическое повреждение

Полученные результаты по изменению уровня Глу-АТ при создании в префронтальной коре головного мозга животных ишемического очага позволили предположить, что введение Глу-АТ сразу после ишемического повреждения может способствовать снижению эксайтотоксичности и улучшению когнитивных функций. В качестве способа доставки Глу-АТ в головной мозг был выбран интраназальный путь, позволяющий быстро доставить антитела непосредственно в мозг [15]. Глу-АТ вводили в острый период эксайтотоксичности глутамата, когда еще очень низок уровень эндогенных антител, т.е. через 1 ч после проведения операции по воспроизведению фотохимического тромбоза сосудов коры. Интрана-

зальное введение Глу-АТ в дозе 250 мкг/кг через 1 ч после операции способствовало сохранению уровня ЛП УРПИ у крыс с двусторонним фототромбозом префронтальной коры на уровне ложнооперированного контроля при проверке сохранения на 8-е сут. после ишемического повреждения (таблица). Интраназальное введение  $\gamma$ -глобулина от интактных кроликов не оказывало влияния на потерю выработанного до ишемии УРПИ (рис. 3). Полученные данные свидетельствуют о выраженном протективном действии Глу-АТ при остром нейродегенеративном повреждении мозга, возможно, благодаря их способности снижать накопление глутамата и тем самым предотвращать гибель нейронов.

Таблица

Сравнительная оценка нейропротективного и антиамнестического действия АТ-ГЛУ и Семакса на модели фотохимического инсульта

Действующие вещества	АТ-ГЛУ, 0,25 мг/кг, и/н, n=9	Семакс, 0,25 мг/кг и/н, n=7
Нейропротекция		
Объем очага при тромбозе в контроле, $V_0$ мм <sup>3</sup>	14	15
Объем очага при тромбозе в опыте, $V_E$ мм <sup>3</sup>	10*	11*
Эффективность лечения, E (%)	28,5	26,7
Антиамнестическое действие		
ЛП ложнооперированных животных, с	300	300
ЛП контрольных животных с фототромбозом, с	50	50
ЛП опытных животных с фототромбозом и веществом, с	260*	240*
Эффективность лечения, A(%)	84	76

Примечание. и/н — интраназально; n — число животных; ЛП — латентный период захода в темную камеру при проверке сохранения на 8-й день после операции. Эффективность лечения рассчитывалась по формуле:

$$E(\%) = 100 \cdot (V_E - V_0) / V_0;$$

$p < 0,05$  по сравнению с контролем;

$$A(\%) = 100 \cdot (\text{ЛП} - \text{ложнооперированные}) - \text{ЛП} (\text{фототромбоз с веществом}) / \text{ЛП} (\text{ложнооперированные}) - \text{ЛП} (\text{фототромбоз})$$

\*  $P < 0,05$  по сравнению с активным контролем

Как препарат сравнения нами был выбран лекарственный препарат «Семакс», который в настоящее время получил большое распространение в отечественной медицинской практике. Он был создан на основе синтетического пептида Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro, являющегося аналогом фрагмента АКТГ(4-10). Было показано, что семакс стимулирует процессы обучения и формирования памяти и обладает нейропротективными свойствами [1].

В опытах на животных при глобальной ишемии мозга, вызванной окклюзией двух сонных артерий, внутрибрюшинное введение семакса уменьшало выраженность неврологических нарушений и увеличивало выживаемость животных [11]. Кроме того, семакс способствовал восстановлению поведенческих реакций, нарушенных после введения крысам 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МРТР) — нейротоксина, избирательно повреждающего дофаминэргические нейроны черной субстанции [12]. Оценку нейропротективного действия семакса проводили на 8-е сутки после воспроизведения коркового инфаркта. Схема введения семакса животным предусматривала возможность его воздействия на процессы, происходящие как в острый период, так и на более поздних сроках ишемии. Введение препарата прекращали за 48 ч до тестирования, чтобы исключить его кратковременные эффекты, влияющие на память и поведение.

Через 8 сут. после индукции коркового инфаркта сравнивали объемы повреждения у групп животных, которым в течение 6 сут. вводили интраназально водный раствор семакса в дозе 250 мкг/кг в сутки с группой, которой по той же схеме вводили дистиллированную воду. Из представленных в таблице данных видно, что введение семакса приводило к уменьшению объема инфаркта в среднем на 26,7% ( $p < 0,05$ ).

Через 8 сут. после фототромбоза коры были также выявлены значительные изменения в поведении животных. Значения ЛП УРПИ снижались по сравнению с исходным уровнем (рис. 3). Систематическое введение семакса животным (250 мкг/кг в сутки, интраназально) после создания двустороннего локального ишемического очага значительно облегчало сохранение и воспроизведение УРПИ (рис. 3) — эффективность антиамнестического лечения составила 76%. Таким образом, были подтверждены полученные ранее данные о нейропротективном и ноотропном действии производного нейропептида АКТГ(4-10) — семакса [8].

Проявление такого действия через 48 ч после отмены семакса свидетельствует о формировании устойчивых изменений, которые могут быть связаны как с уменьшением степени повреждения корковых

структур, так и с изменениями на уровне медиаторных, метаболических или трофических систем.

Полученные результаты указывают на наличие у семакса выраженного нейропротективного и антиамнестического действия при фокальной ишемии коры головного мозга. В основе обнаруженных эффектов может лежать способность семакса снижать активацию провоспалительных реакций, вызванных ишемией [5], и предотвращать гибель нейронов [10]. Эти данные следует рассматривать также как одно из важных экспериментальных доказательств обоснованности использования лекарственного препарата семакса в остром периоде ишемического инсульта головного мозга.

Таким образом, представленные экспериментальные данные сравнительного анализа нейропротективного и ноотропного эффектов АТ-ГЛУ и хорошо изученного лекарственного препарата семакса на модели фотохимически индуцируемого двустороннего тромбоза кровеносных сосудов в префронтальной области коры головного мозга крыс свидетельствуют о выраженном протективном действии как семакса, так ГЛУ-АТ при остром нейродегенеративном ишемическом повреждении мозга. Возможно такое сходное коррегирующее действие исследованных веществ обусловлено влиянием на основные молекулярно-биохимические механизмы нейродегенерации, лежащие в основе ишемического повреждения мозга, регуляторное влияние на которые способствует восстановлению их нормального баланса и таким образом сокращению размеров инсульта и улучшению неврологических показателей.

### Список литературы

1. *Ашмарин И.П., Незавибатько В.Н., Мясоедов Н.Ф.* и др. Ноотропный аналог адренорекортикотропина 4-10 семакс (15-летний опыт разработки и изучения) // Журн. высш. нерв. деят. — 1997. — Т. 47, №2. — С. 420—430.
2. *Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж.Р.* Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. — М.: Высш. Шк., 1991. — 399 с.
3. *Гусев Е.И., Скворцова В.И.* Ишемия головного мозга. — М., 2001. — 501 с.
4. *Евсеев В.А.* Антитела к нейромедиаторам в механизмах нейроиммунопатологии. — М.: Изд. РАМН, 2007. — 144 с.
5. *Мясоедов Н.Ф., Скворцова В.И., Насонов Е.Л.* и др. Исследование механизмов нейропротекторного действия семакса в острый период ишемии // Журн. невропсихиатр. — 1999. — №5. — С. 15—31.
6. *Романова Г.А., Барсков И.В., Островская Р.У.* и др. Поведенческие и морфологические нарушения, вызванные двусторонним фотоиндуцированным тромбозом мозговых сосудов лобной коры мозга крыс // Патол. физиол. и эксперим. терапия. — 1998. — №2. — С. 8—10.

7. *Романова Г.А.* Дизрегуляционная патология / Под ред. Г.Н. Крыжановского. — М., 2002. — С. 605—615.

8. *Романова Г.А., Силачев Д.Н., Шакова Ф.М., Кващенко Ю.Н., Викторов И.В., Шрам С.И., Мясоедов Н.Ф.* Нейропротективное и антиамнестическое действие пептида семакса при экспериментальном ишемическом инфаркте коры головного мозга // Бюлл. exper. биол. и мед. — 2006. — Т. 142, №12. — С. 618—621.

9. *Романова Г.А., Шакова Ф.М., Горбатов В.Ю., Кващенко Ю.Н., Давыдова Т.В.* Влияние антител к глутамату на сохранение условного рефлекса пассивного избегания у крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры мозга // Бюлл. exper. биол. и мед. — 2010. — Т. 149, №3. — С. 261—264.

10. *Сафарова Э.Р., Шрам С.И., Золоторев Ю.А., Мясоедов Н.Ф.* Действие пептида семакса в культуре клеток рhesoscytoma во время оксидативного стресса // Бюлл. exper. биол. и мед. — 2003. — Т. 136, №3. — С. 309—313.

11. *Яковлева Е.В., Кузенков В.С., Федоров В.Н.* и др. Исследование эффективности семакса при глобальной ишемии мозга // Бюлл. exper. биол. и мед. — 1999. — Т. 128, №3. — С. 172—174.

12. *Levitskaya N.G., Sebentsova E.A., Andreeva L.A.* et al. The neuroprotective effects of Semax in conditions of

MPTP -induced lesions of the brain dopaminergic system // *Neurosci. Behav. Physiol.* — 2004. — Vol. 34, №4. — P. 399—405.

13. *Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* 3<sup>rd</sup> ed. / Paxinos G., Watson C. — San Diego, 1997.

14. *Seguela P., Geffard M., Buijs R., Le Moat M.* Antibodies against gamma-aminobutyric acid specificity studies and immunocytochemical results // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1984. — Vol. 81, №12. — P. 3888—3892.

15. *Talegaonkar S., Mishra P.R.* Intranasal delivery: An approach to bypass the blood brain barrier // *Indian J. Pharmacol.* — 2004. — Vol. 36. — P. 140—147.

16. *Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R.* et al. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis // *Ann. Neurol.* — 1985. — Vol. 17, №5. — P. 497—504.

Поступила 12.03.2012

#### Сведения об авторах:

*Шакова Фатимат Мухамедовна*, канд. мед. наук, старш. науч. сотр. лаб. ишемических повреждений ФГБУ «НИИОПП» РАМН

*Давыдова Татьяна Викторовна*, главн. науч. сотр. лаб. нейроиммунологии ФГБУ «НИИОПП» РАМН

А.Н. Родионов<sup>1,2</sup>, А.В. Лобанов<sup>2</sup>, С.Г. Морозов<sup>3,4</sup>, А.А. Сидякин<sup>3,4</sup>, О.М. Аникина<sup>3</sup>,  
И.Е. Грибова<sup>4</sup>, А.С. Рыбаков<sup>3</sup>, А.Н. Проценко<sup>4</sup>, А.Н. Мурашев<sup>1,2</sup>, Т.П. Ключник<sup>5</sup>

## **Влияние высокого уровня антител к ФРН в раннем эмбриогенезе на формирование поведения мышей в постнатальном периоде развития**

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пушкинский государственный естественнонаучный институт», 142290, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 3

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Филиал Института биоорганической химии

им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, 142290, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 6

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

<sup>4</sup> Городская клиническая больница №29 им. Н.Э. Баумана, 111020, Москва, Госпитальная пл., 2

<sup>5</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр психического здоровья» Российской академии медицинских наук, 115522, Москва, Каширское ш., 34

*В проведенном исследовании моделировался аутоиммунный ответ к фактору роста нервов у мышей с пиком концентрации антител на 1 и 3 сут. беременности, и исследовались нарушения в развитии их потомства после рождения. Была выявлена специфика нарушения постнатального развития у мышей, в зависимости от динамики уровня АТ к ФРН на разных сроках раннего эмбриогенеза. Полученные результаты иллюстрируют важную регуляторную роль ФРН в начале закладки нервной системы у животных, что дополняет существующие данные литературы. Установлено, что максимум концентрации АТ к ФРН на 1 сут. эмбрионального развития в сравнении с пиком на 3 сут., вызывает больше нарушений в формировании ранних поведенческих актов и более выраженные аномалии в соматическом созревании. Инфантильность в развитии контактов потомства с их матерями, которая выявлена у мышей с иммунными реакциями, может являться признаком серьезного психического дизонтогенеза. Полученные результаты иллюстрируют важную регуляторную роль ФРН в начале закладки нервной системы у животных.*

**Ключевые слова:** ФРН, беременность, нарушение развития, мыши

A.N. Rodionov<sup>1,2</sup>, A.V. Lobanov<sup>2</sup>, S.G. Morosov<sup>3,4</sup>, A.A. Sidyakin<sup>3,4</sup>, O.M. Anikina<sup>3</sup>,  
I.E. Gribova<sup>4</sup>, A.S. Rybakov<sup>3</sup>, A.N. Protsenko<sup>4</sup>, A.N. Murashev<sup>1,2</sup>, T.P. Klyushnik<sup>5</sup>

## **Influence of high concentration of antibodies to NGF at early embryogenesis on formation of mice behavior in postnatal period**

<sup>1</sup> Pushchino State Institute of Natural Sciences, 3, Prospekt Nauki, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia

<sup>2</sup> Branch of Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, 6, Prospekt Nauki, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia

<sup>3</sup> Institute of general pathology and pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

<sup>4</sup> City Clinical Hospital №29, 2, Gospitalnaya sq., Moscow, 111020, Russia

<sup>5</sup> Mental Health Research Center RAMS, 34, Kashirskoye hwy., Moscow, 115522, Russia

*In this work the influence of high concentration of antibodies to NGF on mouse's progeny has been investigated. During immunization with NGF the highest concentrations of antibodies were created in the first and third days of pregnancy (in different groups of animals). The dependence of abnormalities of mice postnatal development on level of antibodies to NGF at different stages of early embryogenesis has been established. Increasing of abnormalities in the formation of early behavioral acts and more clinically apparent anomalies in the somatic maturation in case of maximum of antibodies on day 1 of pregnancy has been showed. Immune responses to NGF during early embryogenesis of mice cause lag in the formation of behavioral acts. The latter are characterized by difficulties in sensor-motor coordination of the limbs and more clinically apparent in mice with a maximum of antibodies on day 1 of embryonic development. Infantilism in developing of contacts between progeny and mothers detected in mice with immune reactions may be a sign of serious mental dysontogenesis. The accelerated development of working memory established in mice with immune response to NGF requires further study of the development of cognitive abilities in these animals. The obtained results illustrate the important regulatory role of NGF at the early stages of development of the nervous system.*

**Key words:** NGF, pregnancy, postnatal development, antibodies

**Для корреспонденции:** Лобанов Александр Владимирович, канд. биол. наук., мл. науч. сотр., лаб. биологических испытаний, Филиал ФГБУН «ИБХ» РАН. E-mail: lobanov-av@yandex.ru

Фактор роста нервов (ФРН) — белок семейства нейтрофинов, который играет ключевую роль в развитии нервной системы [18]. Известно, что ФРН участвует в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки, выживания нервных клеток. Эффекты ФРН обнаруживаются, начиная с момента деления нейроэпителиальных стволовых клеток в раннем эмбриогенезе [17], однако основные регуляторные функции этого нейтрофина связаны с определенными критическими периодами развития центральной и периферической нервной системы на более поздних стадиях развития [15]. В конце пренатального периода и начале постнатального онтогенеза у грызунов показана роль ФРН в закладке спинномозговых ганглиев [21], созревании периферических симпатических и чувствительных нейронов [11], в формировании соматосенсорной вибрисной системы [14], в регуляции развития холинэргической системы мозга [15]. Аутоиммунные реакции у беременных животных, приводящие к связыванию ФРН и нарушению его регуляторных функций, вызывают структурно-функциональные аномалии развития нервной системы потомства [16, 21]. Повышение уровня антител (АТ) к ФРН часто наблюдается при раннем детском аутизме, шизофрении, болезни Ретта [2, 10]. Однако влияние высокого уровня АТ к ФРН на формирование самых ранних форм поведения у животных остается малоизученным. Неизвестно также, какой эффект оказывает изменение концентрации АТ к ФРН в период нейрогенеза на последующее становление поведения у животных. Создание экспериментальной модели, которая позволяла бы изучать взаимосвязь между изменением уровня АТ у матерей и последующими нарушениями развития потомства, имеет важное практическое значение для клинической медицины.

*Цель исследования* — изучение влияния высокого уровня АТ к ФРН в эмбриональном периоде развития на формирование поведения у мышей в постнатальном онтогенезе.

### Методика

В работе использовались половозрелые самки мышей CD1 SPF-статуса, полученные из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН, Пущино. Для получения аутоиммунного ответа к ФРН мышей иммунизировали трехкратно с интервалом 10 суток. Для иммунизации использовали препарат ФРН, выделенный из спермы быка [12]. На каждую иммунизацию брали 10 мкг антигена на животное в 300 мкл физиологического раствора в полном адьюванте Фрейнда в соотношении 1:1.

Была создана иммуоферментная тест-система для определения АТ к ФРН, которая была охарактеризована как точная, надежная и специфичная. Коэффици-

ент вариации составил не более 5,7%. Раствором ФРН с концентрацией 1 мкг/мл, отдиализованным против стандартного покрывающего буфера, активировали полистирольные планшеты фирмы Nunc (Дания), нанося по 100 мкл в лунку. Инкубацию проводили при +4°C в течение 16 ч. После отмывания от несвязавшейся части АГ планшет обрабатывали 0,05% раствором желатинины в течение 1 ч при 36°C. Далее наносили образцы сыворотки, разведенные в 100 раз. Для построения калибровочной кривой были использованы различные разведения сывороток, интенсивно реагирующих с адсорбированным на планшете АГ. После инкубации с образцами сывороток производили отмывание буфером, после чего наносили вторичные АТ — антивидовые IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США). Реакцию проявляли ТМБ. Определение оптической активности проводили при длине волны 492 нм. Содержание а-АТ оценивали в процентах относительно реакции эталонной сыворотки. В качестве контроля брали пулированную сыворотку неиммунных животных.

Самок, в крови которых уровень АТ к ФРН составлял не менее 420% относительно контроля, реиммунизировали однократным введением антигена через 1—1,5 мес. после предыдущей иммунизации. Через 7 и 10 сут. после иммунизации животных подсаживали к самцам. С учетом того, что максимум концентрации АТ достигается через 10 дней после реиммунизации [4], выбранный протокол позволял достигать пика уровня аАТ к ФРН в организме самок к 1-м и 3-м сут. эмбрионального развития потомства. Началом беременности считался день выявления вагинальной пробки. После рождения у мышей изучали соматическое созревание и формирование поведения с 1 по 21 сут. постнатального развития. Для тестирования потомства использовалась батарея тестов по оценке развивающегося поведенческого фенотипа мышей [1]. Определение порога болевой чувствительности проводили в тесте «Горячая Пластина» [9] в конце гнездового периода на 21-е сутки постнатального развития.

Распределение животных по группам в эксперименте показано в табл. 1. Сравнение животных экспериментальных групп (ФРН1, ФРН3) производили относительно потомства животных, не подвергавшихся иммунизации (интактная группа).

Для результатов, которые оценивались бинарно, вычислялись средние значения для группы в процентах и средние ошибки выборки. Для численных данных рассчитывались средние значения и стандартные ошибки среднего. Бинарные данные сравнивали по Фишеру с определением критерия  $\chi^2$ , численные — методом дисперсионного анализа (программа Statistica 7.0, StatSoft, USA).

Распределение животных по группам в эксперименте

Название группы	Эмбриональные сроки достижения максимума уровня АТ к ФРН, сутки	Количество тестируемых животных в группах
Интактная	—	30
ФРН 1	1	24
ФРН 3	3	20

Развитие соматических признаков в постнатальном периоде у мышей с иммунными реакциями к ФРН в раннем эмбриогенезе

Оцениваемые показатели соматического развития	Группа	Значения показателей развития соматических признаков в среднем по группам		
		3 сутки	4 сутки	5 сутки
Число животных с первичной шерстью, % <sup>1</sup>	Интактная	100	100	100
	ФРН1	72±6	100	100
	ФРН3	100	100	100
Число животных с отошедшими ушными раковинами, % <sup>1</sup>	Интактная	0	21±6	75±7
	ФРН1	0	0 *	77±6
	ФРН3	16±10 <sup>+</sup>	50±14	100
Число разошедшихся пальцев передних конечностей <sup>2</sup>	Интактная	0,00	0,97±0,29	3,41±0,33
	ФРН1	0,00	3,33±0,12 *	3,89±0,31
	ФРН3	0,67±0,47 <sup>+</sup>	4,33±0,25 <sup>+</sup>	5,00±0
Число разошедшихся пальцев задних конечностей <sup>2</sup>	Интактная	0,00	0,97±0,20	3,40±0,21
	ФРН1	0,00	1,46±0,12	3,31±0,31
	ФРН3	0,33±0,22	2,42±0,25 <sup>+</sup>	4,43±0,25 <sup>+</sup>
Число животных с появившимися резцами, % <sup>1</sup>	Интактная	100	100	100
	ФРН1	72±6	100	100
	ФРН3	100	100	100
Число открывшихся глаз <sup>2</sup>	Интактная	0,00	0,73±0,16	1,52±0,15
	ФРН1	0,00	0,42±0,23	2,0±0,31
	ФРН3	0,07±0,07	0,84±0,17	1,79±0,17

Примечание. <sup>1</sup> — численные параметрические показатели (межгрупповые различия определялись тестом Дункана); <sup>2</sup> — бинарные данные (межгрупповые различия определялись с получением критерия  $\chi^2$ ); \* —  $p < 0,05$  различия между интактной группой и группой ФРН1; <sup>+</sup> —  $p < 0,05$  различия между интактной группой и группой ФРН3

## Результаты и обсуждение

Соматическое развитие оценивалось по параметрам набора массы тела, расхождения пальцев на конечностях, появления шерсти, появления резцов, открытия глаз. Наиболее значимым изменением соматического развития мышей, с иммунным ответом к ФРН, было отставание в увеличении массы тела (рис. 1). Задержка была значительнее у животных с пиком иммунного ответа на 1 сут. эмбрионального развития. У мышей группы ФРН1 масса тела была значимо меньше чем у животных группы ФРН3 в конце гнездового периода 19—21 сут. Нарушения в динамике созревания других соматических признаков у животных экспериментальных групп представлены в табл. 2.

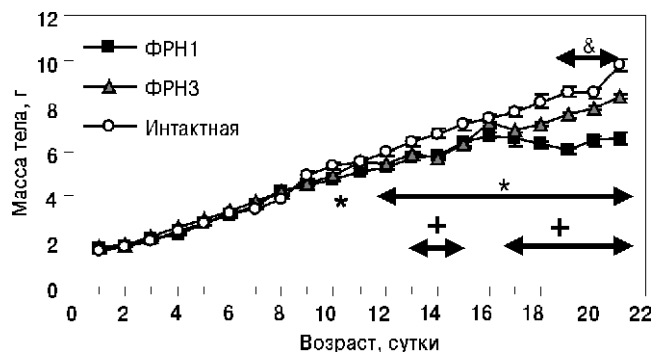


Рис. 1. Влияние иммунных реакций к ФРН в эмбриогенезе на набор массы тела в постнатальном периоде у мышей:

\* —  $p < 0,05$  различия между интактной группой и группой ФРН1; <sup>+</sup> —  $p < 0,05$  различия между интактной группой и группой ФРН3; & —  $p < 0,05$  различия между группами ФРН1 и ФРН3, тест Дункана

У мышей группы ФРН1 были показаны отставания в отхождении ушных раковин на 4 сутки постнатального развития, ускорение в расхождении пальцев передних конечностей относительно интактной группы. У мышей группы ФРН3 были выявлены только ускорения в развитии признаков в сравнении с контролем: отхождении ушных раковин на 3 сутки, расхождении пальцев на передних конечностях на 3—4 сутки, и задних конечностей на 4—5 сутки. Изменений в появлении первичного шерстного покрова, резцов, открытии глаз у мышей экспериментальных групп в сравнении с контролем не выявлено. Ускорение в созревании отдельных соматических признаков, на фоне отставания в наборе массы тела происходит в результате действия различных нейротератогенов [5]. Выявленные нами эффекты дополняют ранее установленные нарушения в физическом созревании у мышей с иммунной реакцией к ФРН в пренатальном и постнатальном онтогенезе [3]

#### Формирование ранних поведенческих актов

У мышей экспериментальных групп были выявлены отставания в формировании поведения, обеспечивающего обретение опоры передними конечностями на основе тактильной чувствительности. У животных с пиком концентрации АТ на 1-е сутки нарушения были выявлены на 10 и 11 сут. постнатального развития, а у мышей с пиком АТ на третьи сутки — на 10 сут. (рис. 2). В группе ФРН1 координация движений передних конечностей была хуже, чем в группе ФРН3 на 11-е сутки. Формирование сложных координаций движений изучалось по развитию способности мышей спускаться по вертикальному канату. Было показано, что в группе ФРН1 меньшее число животных могло спуститься по канату на 14-е, 15-е и 16-е сутки, в группе ФРН3 — на 15-е и 16-е сутки (рис. 3).

Способность спускаться по канату требовало развития координации конечностей на основе тактильной и

зрительной афферентации. Исследование координации конечностей в ответ на тактильные стимулы вибрисс у экспериментальных животных на 14-е и 15-е сутки отличий от контроля не выявило (животные с сформировавшимся поведением на 14-е сутки составляли в интактной группе  $94 \pm 5\%$ , ФРН1 —  $100 \pm 0\%$ , ФРН3 —  $100 \pm 0\%$ , на 15-е сутки способность была сформирована у  $100\%$  мышей всех групп). Тестирование развития координации движений на основе зрительной чувствительности показало задержку в формировании этой способности у мышей только группы ФРН1 на 15-е и 16-е сутки (животные, демонстрирующие поведение на 15-е сутки, составляли в интактной группе  $84 \pm 7\%$ , ФРН1 —  $24 \pm 8\%$ , ФРН3 —  $71 \pm 12\%$  на 16-е сутки —  $85 \pm 6$ ,  $31 \pm 9$  и  $50 \pm 18\%$  соответственно). Это дает основание полагать, что у мышей группы ФРН1 одной из основных причин задержки развития способности спускаться по канату было отставание в формировании координации движений на основе зрения. В группе ФРН3, при отсутствии нарушений в формировании простых координаций, изменения могли быть связаны с нарушением консолидирующей функции ЦНС, в первую очередь коры мозга. Известно, что полная или частичная потеря способности передвигаться по вертикальному канату возникает у грызунов с микроцефалией мозга, вызванной воздействием ионизирующего излучения в эмбриогенезе [13]. В нашем исследовании наиболее выраженные осложнения были выявлены при пике АТ к ФРН на 1-е сутки эмбрионального развития.

#### Формирование поведения тактильного контакта у мышей с их матерями в раннем постнатальном периоде

В первые дни жизни тактильный контакт потомства и матерей обеспечивает выживание пойклотермных мышат, препятствуя переохлаждению, и является необходимым условием для реализации сосательного рефлекса. Наблюдаемое поведение является прови-

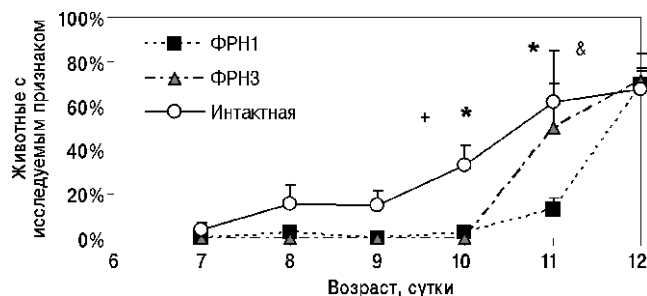


Рис. 2. Отставания в формировании способности координировать движения передних конечностей на основе тактильной чувствительности в постнатальном периоде у мышей с пиком АТ к ФРН на 1 и 3 сут. эмбриогенеза: \* —  $p < 0,05$  различия между интактной группой и группой ФРН1; + —  $p < 0,05$  различия между интактной группой и группой ФРН3; & —  $p < 0,05$  различия между группами ФРН1 и ФРН3, критерий  $\chi^2$

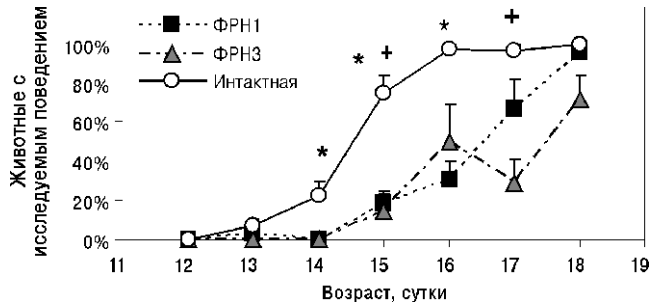


Рис. 3. Отставания в формировании способности спускаться по вертикальному канату в постнатальном периоде у мышей с пиком АТ к ФРН на 1-е и третьи сутки эмбриогенеза: \* —  $p < 0,05$  различия между интактной группой и группой ФРН1; + —  $p < 0,05$  различия между интактной группой и группой ФРН3, критерий  $\chi^2$

зорным, и угасает в процессе появления шерстного покрова и усложнения пищевого поведения у животных [20]. У контрольных мышей наблюдалось классическое проявление этого поведения с 1-х по 5-е сутки и последующим снижением с 6-х по 10-е сутки. У мышей экспериментальных групп происходила задержка в возникновении второй фазы поведения на 6-е и 7-е сутки постнатального развития в сравнении с контролем (рис. 4). Время появления шерстного покрова и роста резцов (табл. 2) у мышей этих групп относительно контроля не изменялось. Поэтому выявленный инфантилизм являлся следствием специфических нарушений в созревании мозга. Нарушение формирования поведения тактильного контакта потомства и матерей в онтогенезе может являться одним из признаков дальнейшего нейropsychического дизонтогенеза, которое было показано при изучении экспериментальной модели шизофрении на крысах [8].

#### Формирование пространственной ориентации и пространственной рабочей памяти у мышей

Изучение формирования пространственной ориентации и рабочей памяти у незрячих мышей проводилось в Y-образном лабиринте со сменой положения домашних опилок при каждом последующем помещении животного в лабиринт. Ориентирование животных в незнакомой обстановке оценивалось по способности найти отсек с домашним запахом при первом помещении в лабиринт. Было показано, что мыши всех групп находили отсек с домашним запахом (рис. 5А). Однако животные группы ФРН1 на 11-е и 14-е сутки постнатального развития существенно чаще посещали чистый отсек лабиринта, чем контрольные (рис. 5Б). Показано, что в чистый рукав лабиринта животные попадали уже после того, как находили отсек с домашними опилками (время посещения домашнего отсека на 11 сут. —  $20,6 \pm 1,9$  с, на 14 сут. —  $14,5 \pm 2,4$  с; время посещения чистого отсека на 11 сут. —  $26,5 \pm 1,4$  с, на 14 сут. —  $16,8 \pm 3,2$  с). Полученные результаты свидетельствуют о том, что у мышей экспериментальных групп не возникало слож-

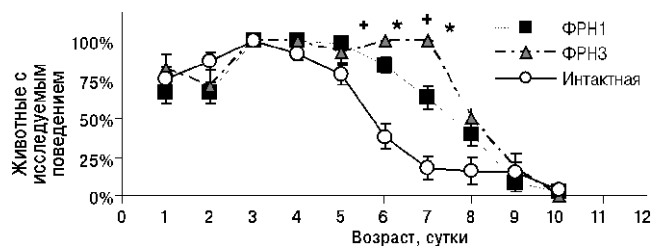


Рис. 4. Задержка в угасании детского поведения тактильного контакта мышей групп ФРН1 и ФРН3 их с матерями в постнатальном периоде: \* —  $p < 0,05$  различия между интактной группой и группой ФРН1; + —  $p < 0,05$  различия между интактной группой и группой ФРН3, критерий  $\chi^2$

ностей в формировании ориентации в пространстве. Выявленные изменения у группы ФРН1, вероятно, связаны с повышенной двигательной активностью мышей, которая может развиваться у животных с аутоиммунным ответом к ФРН [3].

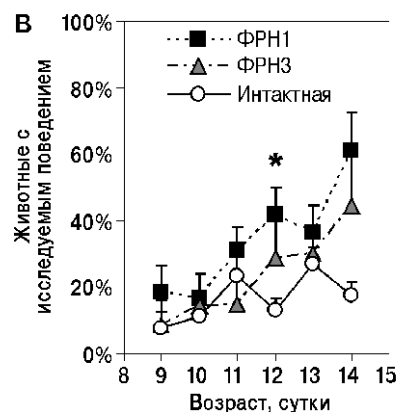
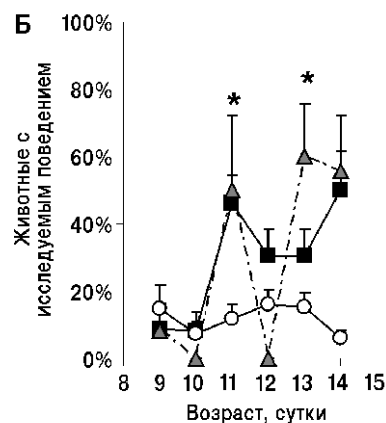
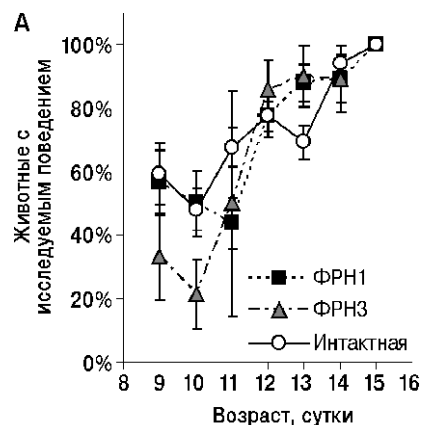


Рис. 5. Развитие способности выбирать домашний отсек (А), чистый отсек (Б) при 1-м помещении в лабиринт, а также выбирать чистый отсек (В) при 3-м помещении в лабиринт в постнатальном периоде у мышей \* —  $p < 0,05$  различия между интактной группой и группой ФРН1, критерий  $\chi^2$



Оценка формирования пространственной рабочей памяти осуществлялась при 2-м и 3-м помещении мышей в лабиринт после смены стороны размещения домашних опилок на противоположную. Оценивался заход мышей в чистый отсек, попадание в который являлось ошибкой при выборе домашнего отсека и свидетельствовало об использовании животными для ориентации рабочей памяти. У животных группы ФРН1 формирование памяти шло ускоренными темпами, что проявлялось в увеличении числа особей заходивших в чистый отсек при 3-м помещении в лабиринт в сравнении с контролем на 12 сут. (рис. 5В).

У мышей группы ФРН3 была показана только тенденция к ускоренному развитию этой способности. Известно, что дефицит развития мозга может проявляться не только в отставании, но и во временном ускорении развития поведенческих актов [6]. При исследовании когнитивных способностей у молодых мышей с АТ к ФРН в период эмбриогенеза, было выявлено отставание в формировании памяти на более позднем этапе развития, в возрасте 1 мес. [3]. Одной из возможных причин нарушения динамики развития памяти в нашем исследовании могут быть аномалии созревания холинэргической системы конечного мозга.

#### *Болевая чувствительность у мышей в конце гнездового периода*

Изменений порога болевой чувствительности в тесте «Горячая пластина» у мышей с высоким уровнем АТ к ФРН в раннем эмбриогенезе в сравнении с контролем выявлено не было. Показатель латентного периода облизывания передних лап у животных интактной группы составлял  $9,9 \pm 0,5$  с, у мышей ФРН1 —  $11,1 \pm 1,2$  с, у мышей ФРН3 —  $10,2 \pm 1,4$  с. Латентный период облизывания задних лап у мышей интактной группы составлял  $20,5 \pm 1,1$  с, у мышей ФРН1 —  $22,1 \pm 2,2$  с, у мышей ФРН3 —  $23,3 \pm 3,0$  с. Животные интактной группы в среднем подпрыгивали на горячей пластине через  $58,5 \pm 0,7$  с, группы ФРН1 —  $58,5 \pm 0,7$  с, группы ФРН3 —  $60,0 \pm 0$  с. Латентный период подпрыгивания у мышей группы ФРН1 был достоверно короче, чем у мышей группы ФРН3. Известно, что ФРН играет важную роль в созревании чувствительных волокон спинного мозга, участвующих в передаче болевой чувствительности, а также необходим для выживания ноцицепторов в пренатальном периоде развития животных [19]. Снижение болевой чувствительности выявлено у трансгенных мышей с дефицитом ФРН, у животных с аутоиммунным ответом к ФРН в пренатальном онтогенезе [3, 19] и во взрослом состоянии [7]. Известно, что порог болевой чувствительности выше у животных с более интенсивной аутоиммунной реакцией к ФРН [7].

Поэтому различия, выявленные в нашем исследовании на уровне тенденции, вероятно, являются следствием действия АТ к ФРН в момент созревания нервных волокон и формирования ноцицепторов в онтогенезе у мышей, но в недостаточно высокой концентрации для того, что бы вызвать достоверные изменения.

Таким образом, в нашем исследовании была выявлена специфика нарушения постнатального развития у мышей, в зависимости от динамики уровня АТ к ФРН на разных сроках раннего эмбриогенеза. Полученные результаты иллюстрируют важную регуляторную роль ФРН в начале закладки нервной системы у животных, что дополняет существующие данные литературы [17]. Установлено, что максимум концентрации АТ к ФРН на 1 сут. эмбрионального развития в сравнении с пиком на 3 сут., вызывает больше нарушений в формировании ранних поведенческих актов и более выраженные аномалии в соматическом созревании. Инфантильность в развитии контактов потомства с их матерями, которая выявлена у мышей с иммунными реакциями, может являться признаком серьезного психического дизонтогенеза. Факт ускоренного развития рабочей памяти, выявленный у мышей с иммунной реакцией к ФРН, требует дальнейшего изучения развития когнитивных способностей у этих животных. Полученные результаты также определили необходимость дальнейшего исследования влияния высокого уровня АТ к ФРН на разных этапах пренатального развития у мышей.

*Работа осуществлена при поддержке РГНФ, проект номер №09-06-01056а.*

#### **Список литературы**

1. *Зарайская И.Ю., Александрова Е.А.* Сравнительный подход к изучению системогенеза ранних поведенческих актов // XVIII Съезд физиологического общества им. И.П. Павлова: Тез. докл. — Казань, 2001. — С. 93.
2. *Козловская Г.В., Ключник Т.П., Горюнова А.В.* и др. Аутоантитела к фактору роста нервов у детей с различными формами психического дизонтогенеза и из группы высокого риска по шизофрении // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 2000. — Т. 100, №3. — С. 50—52.
3. *Краснолобова С.А.* Аутоантитела к фактору роста нервов при нарушении развития нервной системы: В эксперименте и клинике: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.биол.н. — М., 2005. — 18 с.
4. Практикум по иммунологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Под ред. И.А. Кондратьевой и А.А. Ярилина. — 2-е изд-е, испр. и доп. — М.: Издательский центр «Академия», 2004. — 272 с.
5. *Benesova O., Tejkalova H., Kristofikova Z.* et al. Neuro-immuno-teratogenicity of drugs used in neonatal pharmacotherapy in relation to the ontogenic stage at the time of their administration // Gen. Physiol. Biophys. — 1999. — Vol. 18. — P. 21—27.

6. *Chiavegatto S., Oliveira C.A., Bernard M.M.* Prenatal exposure of rats to diphenhydramine: effects on physical development, open field, and gonadal hormone levels in adults // *Neurotoxicol. Teratol.* — 1997. — Vol. 19, №6. — P. 511—516.
7. *Chudler E.H., Anderson L.C., Byers M.R.* Nerve growth factor depletion by autoimmunization produces thermal hypoalgesia in adult rats // *Brain Res.* — 1997. — Vol. 765, №2. — P. 327—330.
8. *Degen S.B., Ellenbroek B.A., Wiegant V.M.* et al. The development of various somatic markers is retarded in an animal model for schizophrenia, namely apomorphine-susceptible rats // *Behav. Brain Res.* — 2005. — Vol. 57, №2. — P. 369—377.
9. *Eddy N.B., Leimbach D.* Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- dithienylbutylamines // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 1953. — Vol. 107, №3. — P. 385—393.
10. *Gioiosa L., Iannitelli A., Aloe L.* Stress, anxiety schizophrenia and neurotrophic factors: the pioneer studies with nerve growth factor // *Riv. Psichiatr.* — 2009. — Vol. 44, №2. — P. 88—94. Review.
11. *Gorin P.D., Johnson E.M.* Experimental autoimmune model of nerve growth factor deprivation: effects on developing peripheral sympathetic and sensory neurons // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1979. — Vol. 76, №10. — P. 5382—5386.
12. *Harper G., Glanville R., Thoenen H.* The purification of nerve growth factor from bovine seminal plasma // *J. Biol. Chem.* — 1982. — Vol. 257, №14. — P. 8541—8548.
13. *Jensh R.P., Brent R.L.* Effects of prenatal X-irradiation on the 14<sup>th</sup>-18<sup>th</sup> days of gestation on postnatal growth and development in the rat // *Teratology.* — 1988. — Vol. 38, №5. — P. 431—441.
14. *Jhaveri S., Erzurumlu R.S., Laywell E.D.* et al. Excess nerve growth factor in the periphery does not obscure development of whisker-related patterns in the rodent brain // *J. Comp. Neurol.* — 1996. — Vol. 374, №1. — P. 41—51.
15. *Koliatsos V.E., Price D.L., Gouras G.K.* et al. Highly selective effects of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin-3 on intact and injured basal forebrain magnocellular neurons // *J. Comp. Neurol.* — 1994. — Vol. 343, №2. — P. 247—262.
16. *Levi-Montalcini R., Booker B.* Destruction of the sympathetic ganglia in mammals by antiserum to a nerve-growth protein // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1960. — Vol. 46. — P. 384—391.
17. *Maisonpierre P.C., Belluscio L., Friedman B.* et al. NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression // *Neuron.* — 1990. — Vol. 5, №4. — P. 501—509.
18. *Maness L.M., Kastin A.J., Weber J.* et al. The neurotrophins and their receptors: Structure, function, and neuropathology // *Neurosci. Biobehav. Rev.* — 1994. — Vol. 18. — P. 143—159.
19. *Mendell L.M., Albers K.M., Davis B.M.* Neurotrophins, nociceptors, and pain // *Microsc. Res. Tech.* — 1999. — Vol. 45, №4—5. — P. 252—261. Review.
20. *Roubertoux P.L., Bauman L., Raguenaud S.* et al. Early development in mice. IV. Age at dissapiance of the rooting response: genetic analysis in newborn mice // *Behavior Genetics.* — 1987. — Vol. 17, №5. — P. 453—464.
21. *Ruit K.G., Elliot J.L., Osborne P.A.* et al. Selective dependence of mammalian dorsal root ganglion neurons on nerve growth factor during embryonic development // *Neuron.* — 1992. — Vol. 8. — P. 1—20.

Поступила 27.04.12

#### Сведения об авторах:

Родионов А.Н., инженер лаб. биологических испытаний, Филиал ФГБУН «ИБХ» РАН  
 Морозов Сергей Георгиевич, канд. мед. наук, чл.-кор. РАМН, зав. лабораторией функциональной иммунохимии, зам. дир. по научной работе, ФГБУ «НИИОПП» РАМН  
 Сидякин Александр Александрович, науч. сотр., ФГБУ «НИИОПП» РАМН  
 Аникина Оксана Михайловна, науч. сотр., ФГБУ «НИИОПП» РАМН  
 Грибова Иветта Евгеньевна, канд. мед. наук, ГКБ №29 им. Н.Э. Баумана  
 Рыбаков Антон Станиславович, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., ФГБУ «НИИОПП» РАМН  
 Проценко Алексей Николаевич, канд. мед. наук, врач, ГКБ №29 им. Н.Э. Баумана  
 Мурашев Аркадий Николаевич, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. биологических испытаний, Филиал ФГБУН «ИБХ» РАН

В.Л. Козловский

## Оценка влияния галоперидола на изменение реакции развития спонтанной каталепсии при субхроническом введении агонистов и антагонистов дофаминергической передачи

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Санкт-Петербургский научно-исследовательский психоневрологический институт им. В.М. Бехтерева»,  
193019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 3

В работе на мышах SHR было изучено влияние субхронического п/к введения галоперидола на развитие феномена спонтанной каталепсии у мышей, получавших на протяжении 12 дней в/б фенамин 10 мг/кг поочередно с галоперидолом 5 мг/кг («нейрохимическая агрессия»). Показано, что поочередные инъекции фенамина с галоперидолом сокращают продолжительность спонтанной каталепсии. Галоперидол, вводимый в дозе 0,25 мг/кг п/к каждый день предупреждал эти изменения, но нарушал восстановление феномена спонтанной каталепсии. В меньшей дозе 0,1 мг/кг галоперидол существенного влияния на результаты исследования не оказывал. Сделан вывод о том, что субхроническое введение галоперидола, оказывая защитное действие в остром периоде «нейрохимической агрессии», может тормозить процессы восстановления функций мозга.

**Ключевые слова:** мыши, каталепсия, галоперидол, фенамин, шизофрения

V.L. Kozlovsky

## Influence of Haloperidol on changes in catalepsy development reaction during subchronic injections of dopamine agonists and antagonists

Bekhterev Psychoneurology Institute, 3, Bekhtereva str., 193019, St. Petersburg, Russia

The influence of haloperidol intracutaneous injections on the development of spontaneous catalepsy phenomenon in SHR mice which received intraperitoneal injections of d,l-amphetamine (10 mg/kg) and haloperidol (5 mg/kg) alternately during 12 days, was studied («neurochemical aggression»). It was demonstrated that alternating injections of d,l-amphetamine and haloperidol decrease the spontaneous catalepsy duration. Daily intracutaneous injections of haloperidol (0.25 mg/kg) prevented these changes but disrupted the spontaneous catalepsy phenomenon recovery by the 10-th day of measurements. A lower dosage (0.1 mg/kg) of haloperidol did not affect the results of the research. A conclusion was made that subchronic injections of haloperidol might have a protective effect in acute period of «neurochemical aggression» but slow down brain functioning recovery.

**Key words:** mice, catalepsy, haloperidol, d,l-amphetamine, schizophrenia

Хорошо известно, что в соответствии с дофаминовой парадигмой развития психоза изучение антипсихотического действия новых препаратов проводится на моделях, отражающих функциональную активность дофаминергической передачи. Однако известные модели, на наш взгляд, не могут в полной мере воспроизводить хронически прогрессивные психотические расстройства, поскольку они способны воспроизводить лишь острые эффекты, вызываемые дофаминпотенцирующими средствами и, по сути дела, моделируют только острые эффекты интоксикации этими препаратами (фенаминовая и апоморфиновая сте-

реотипия, токсичность фенамина, антагонизм с триф-тазином и галоперидолом). Подобные изменения могут иметь место в клинических условиях только при передозировках соответствующих препаратов, но их наличие трудно представить себе при хроническом эндогенном психозе.

Нам представляется, что ближе к клиническому характеру течения хронически прогрессивных психозов может быть состояние «нейрохимической агрессии», вызванное у животных путем проведения поочередных введений агонистов и антагонистов дофаминергической передачи [4]. Подобная манипуляция, безусловно, сказывается на течении нейрохимических процессов и развитии нейрофизиологических эффектов, вызывающих изменения поведения животных. Следует заметить, что аналогичный подход был использован при

Для корреспонденции: Козловский Владимир Леонидович, д-р мед. наук, главн. научн. сотр. отд. клинико-экспериментальных исследований новых психотропных средств ФГБУ С.-Пб. «НИПНИ им. В.М. Бехтерева». E-mail: kvl1958@mail.ru

моделировании алкоголизма, когда введение этанола животным осуществляли дробно с чередованием периодов лишения и алкоголизации [8].

Ранее было показано, что проведение «нейрохимической агрессии» поочередными инъекциями галоперидола и фенамина вызывало у животных изменение поведения в тесте на катаlepsию [1], что позволило применить данный метод и в настоящей работе. Поскольку любые изменения мозговой деятельности реализуются в изменении двигательного поведения, то косвенно об уровне функционирования дофаминергических структур мозга можно судить на основании результатов оценки поведения животных в тестах, отражающих активность этих структур мозга.

*Цель исследования* — изучение изменения выраженности спонтанной катаlepsии при субхроническом введении галоперидола, при проведении «нейрохимической агрессии», вызванной поочередными инъекциями галоперидола и фенамина.

Галоперидол был использован в работе, с одной стороны, как препарат «нейрохимической агрессии» (вводили поочередно с фенамином), а с другой, как эталонный лекарственный препарат (вводили каждый день), обладающий стандартной антипсихотической активностью. Выбор галоперидола в последнем случае был обусловлен определенной «чистотой» его влияния преимущественно на дофаминергическую передачу.

### Методика

В работе использовано около 100 белых беспородных мышей SHR массой 22—28 г, полученных из питомника Рапполово. Животных не более 10 штук содержали в стандартных клетках размером 80х30х30 см. Все мыши предварительно разделены на 4 группы по 10—15 особей в каждой. В первых трех группах мышам однократно через день внутрибрюшинно (в/б) вводили галоперидол в дозе 5 мг/кг поочередно с фенамином в дозе 10 мг/кг. Мыши 4-й группы получали каждый день в/б эквивалентное количество физиологического раствора. Кроме того, животным 1-й и 2-й группы каждый день однократно подкожно (п/к) вводили галоперидол в дозе 0,1 мг/кг и 0,25 мг/кг соответственно. Мыши 3-й группы получали физиологический раствор п/к каждый день.

В работе применялись следующие препараты: галоперидол (А.О. Геден Рихтер, Венгрия), сернокислый D,L-фенамин (РФ). Таким образом, 3-я и 4-я группы мышей были использованы в качестве контрольных. При этом 4-й группе животных физиологический раствор вводили как в/б, так и п/к каждый день. Мышам 3-й группы физиологический раствор вводили только п/к, на фоне поочередных в/б

введений галоперидола и фенамина. Режим в/б введения галоперидола мышам был выбран исходя из данных по фармакокинетике. Известно, что спустя сутки галоперидол уже не определяется в мозге крыс [6], мы предполагаем, что и у мышей наблюдается подобная фармакокинетика этого препарата.

Спустя 14 сут. (срок, в течение которого всем подопытным животным вводили фенамин и галоперидол, всего по 6 инъекций каждого препарата) у мышей оценивали выраженность «спонтанной» катаlepsии, т.е. измерение продолжительности катаlepsии проводили при отсутствии введения каких бы то ни было препаратов, ее оценивали на третьи сутки и спустя неделю на 10-е сутки после окончания чередующихся введений фенамина и галоперидола. Для оценки поведения животных использовали тест измерения катаlepsии [3] в следующей модификации: передние лапы животного помещали на горизонтальную проволочную перекладину, расположенную на высоте 4 см и определяли время удержания данной позы («поза лектора») за 60 секунд через интервалы — 15, 30, 60, 90 и 120 мин от начала наблюдения. Затем подсчитывали среднее время сохранения позы для группы животных.

Результаты обрабатывали на РС, подсчитывая  $M \pm m$ , статистическую значимость между группами определяли по непараметрическим критериям «U» Манна—Уитни и Краскела—Уоллиса, а статистическую значимость в связанных группах выявляли с помощью критерия знаков.

### Результаты и обсуждение

Сравнение, полученных результатов у животных, получавших в/б галоперидол 5 мг/кг и фенамин 10 мг/кг при п/к введении физиологического раствора (3-я группа) и контрольных мышей (4-я группа), получавших только физиологический раствор как внутрибрюшинно, так и подкожно, выявило следующие различия: продолжительность спонтанной катаlepsии у мышей 3-й группы была выражена слабее, чем у животных 4-й группы. Субхроническое введение фенамина поочередно с галоперидолом вызывало отчетливую тенденцию к уменьшению выраженности катаlepsии у мышей по средней продолжительности удержания позы ( $0,1 < p < 0,2$ ) (рис. 1). Анализ результатов по разным временным интервалам (тест Манна—Уитни), т.е. по каждому из пяти последовательных измерений показал, что на третьи сутки измерения достоверные отличия выявлены на 15-й и 60-й мин оценки ( $p < 0,05$ ) на 30-й и 120-й мин выявлена отчетливая тенденция в том же направлении изменений ( $0,1 < p < 0,2$ ). На 10-е сутки оценки существенные различия были выявлены на 60-й и 90-й мин ( $p < 0,05$ ), отчетливая тенденция на 15-й мин ( $p < 0,1$ ).

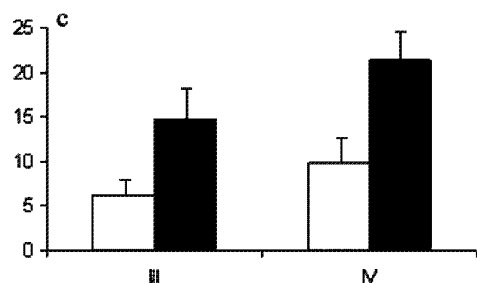


Рис. 1. Продолжительность феномена спонтанной каталепсии у мышей по окончании проведения «нейрохимической агрессии». На оси абсцисс средние значения продолжительности каталепсии в секундах.

III — животные с «нейрохимической агрессией», которым в/б вводили галоперидол (5 мг/кг) поочередно с фенамином (10 мг/кг) в течение 12 сут. (всего по 6 инъекций каждого препарата);

IV — животные, которым по аналогичной схеме вводили в течение 12 сут. физиологический раствор.

Светлый столбик — измерение каталепсии на третьи сутки после окончания введений фенамина и галоперидола, темный — на 10-е сутки

Вероятно, наблюдаемые изменения поведения могли быть вызваны нарушением механизмов нормальной деятельности катехоламинергических структур мозга. Поскольку предпринятая процедура не просто стимулировала или тормозила соответствующую медиаторную систему, а вызывая в ее активности периодические полярные колебания, могла оказывать дестабилизирующее действие не только на нее, но и на вторично связанные с ней нейрохимические процессы. Как было отмечено, аналогичный подход, приводящий к функциональной дестабилизации нормальных физиологических механизмов мозга был использован и при моделировании алкоголизма [8]. Последний метод рассматривают как наиболее адекватный прием моделирования заболевания на животных. Вероятно, любые хронически прогрессирующие болезни ЦНС, протекающие с периодами обострений и ремиссий, имеют флюктуирующий характер с периодическим изменением функциональной активности нейрохимических систем мозга. По-видимому, при этом особое значение для специфики патологических нарушений приобретает инициальный нейрохимический фактор, запускающий каскад последующих вторичных изменений.

Известно, что при хроническом введении галоперидола и других нейролептиков развивается компенсаторное повышение адренергической медиации [2, 5, 9], в то же время, хроническое введение фенамина вызывает обратный эффект, эффект торможения активности адренергической передачи мозга [10]. Вероятно, искусственно провоцируемые в течение 2-недельного периода разнонаправленные сдвиги моноаминергической активности вызывают существенное повреждение указанных систем мозга, что проявляется

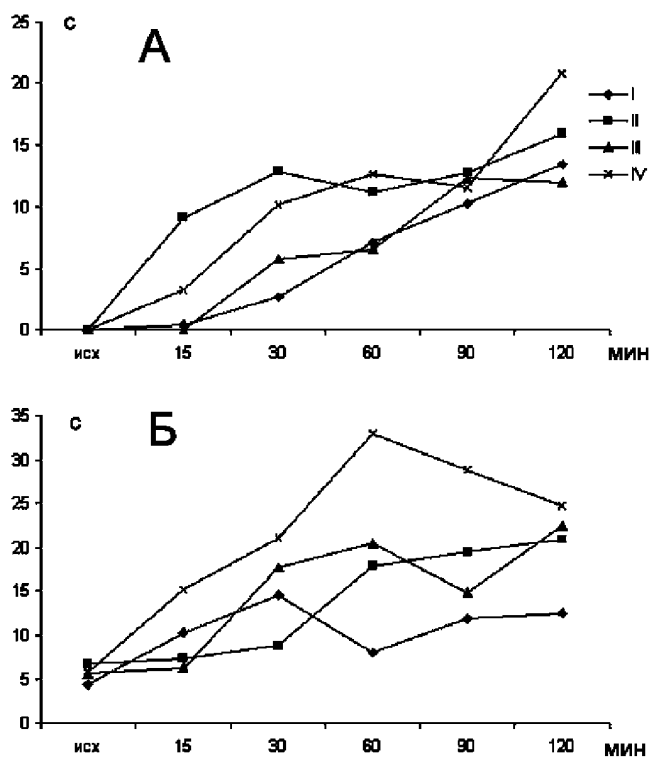


Рис. 2. Изменение выраженности спонтанной каталепсии у мышей всех экспериментальных групп на третьи и 10-е сутки после введения агонистов/антагонистов дофаминергической передачи:

I — мыши, которым на фоне в/б введения галоперидола (5 мг/кг) поочередно с фенамином (10 мг/кг), каждый день (12 инъекций) вводили п/к галоперидол в дозе 0,1 мг/кг;

II — мыши, которым на фоне в/б введения галоперидола (5 мг/кг) поочередно с фенамином (10 мг/кг), каждый день (12 инъекций) вводили п/к галоперидол в дозе 0,25 мг/кг;

III — животные, которым в/б вводили галоперидол 5 мг/кг поочередно с фенамином 10 мг/кг в течение 12 сут. (всего по 6 инъекций каждого препарата);

IV — животные, которым по аналогичной схеме вводили в течение 12 сут. физиологический раствор;

А — измерение каталепсии спустя 2 сут. после введений агонистов/антагонистов дофаминергических средств;

Б — измерение каталепсии спустя 10 сут. после введений агонистов/антагонистов дофаминергических средств

ся нарушением формирования каталептогенного поведения у мышей. Любопытно, что регистрируемые изменения поведения (уменьшение продолжительности спонтанной каталепсии) носили достаточно стойкий характер, спустя 10 сут. после окончания введения фенамина и галоперидола эти результаты хорошо воспроизводились (рис. 1).

Результаты, отражающие поведение мышей всех групп в тесте на развитие каталепсии представлены на рис. 2. Хорошо заметны следующие тенденции: с течением времени, начиная с 3-х суток измерения спонтанной каталепсии к 10-м суткам оценки, наблюдаемая картина претерпевала небольшие изменения по усред-

ненным для групп значениям. Характер развития спонтанной катаlepsии на третьи сутки после окончания введения препаратов у контрольных животных в 3-й и 4-й группах существенно не изменялся и к 10-м суткам регистрации, выраженность спонтанной катаlepsии практически во всех измеряемых точках была ниже у животных 3-й группы (получавших в/б галоперидол/фенамин и п/к физиологический раствор), чем у мышей 4-й группы (в/б физиологический раствор и п/к физиологический раствор).

При сравнении результатов, зарегистрированных у подопытных мышей 1-й и 2-й групп, была выявлена динамика изменений показателей в сравнении с результатами, полученными у животных 3-й контрольной группы. Различия между 2-й и 3-й группами на третьи сутки после окончания введения показало некоторое увеличение спонтанной катаlepsии у мышей 3-й группы —  $10,3 \pm 3,7$  и  $6,1 \pm 1,8$  с соответственно (рис. 2А), что было близко к результатам контрольной (4-й) группы  $9,7 \pm 2,5$  с, в которой животным вводили только физиологический раствор. На 10-е сутки при измерении спонтанной катаlepsии, отличий между 1-й, 2-й и 3-й группами практически не определялось, соответственно  $10,3 \pm 1,5$ ;  $13,6 \pm 2,8$ ;  $14,6 \pm 3,1$  с, но при этом отличия всех этих групп от 4-й ( $21,4 \pm 2,9$  с) (рис. 2Б) были хорошо заметны (Краскел—Уоллис, статистически значимо для точек 60 и 90 мин соответственно  $H=8,01$ ,  $p<0,04$  и  $H=8,70$ ,  $p<0,03$ ).

Анализ межгрупповых различий мышей, получавших галоперидол в качестве «терапевтического воздействия» показал достоверность различий (тест Манна—Уитни) между 2-й и 3-й группами на 15 мин оценки катаlepsии на третьи сутки ( $p<0,04$ ), на 10-е сутки достоверно 60 и 120 мин ( $p<0,05$ ) для групп 1 и 3.

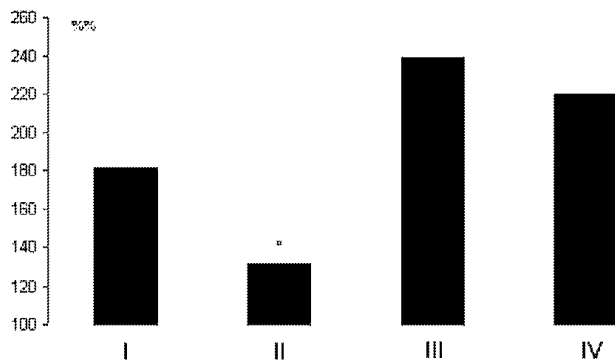


Рис. 3. Динамика восстановления продолжительности катаlepsии у подопытных животных по окончании введения агонистов/антагонистов дофаминергической передачи.

Высота столбиков в процентах отражает динамику изменения продолжительности спонтанной катаlepsии у подопытных мышей к 10-м суткам. За 100% приняты результаты измерения катаlepsии на третьи сутки по окончании введения фенамина и галоперидола.

\* —  $p<0,04$  между II и IV группами

Еще более выраженные отличия между группами выявлялись тогда, когда измерялась динамика изменения катаlepsии непосредственно внутри одной группы с 1-х по третьи сутки (после окончания введения препаратов) к 10-м суткам оценки (группа 1 —  $p<0,04$ ; 2 —  $p>0,05$ ; 3 —  $p>0,05$ ; 4,  $p<0,01$ , критерий «Знаков»). На рис. 3 результаты представлены в процентах относительно данных первого измерения. При этом статистически значимые отличия были выявлены между 2-й и 4-й группами  $3,2 \pm 4,2$  и  $11,7 \pm 2,7$  с соответственно ( $p<0,04$ , тест Манна—Уитни).

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о том, что субхроническое п/к введение галоперидола, на фоне чередующихся в/б инъекций того же препарата по очереди с фенамином, оказывает по крайней мере два эффекта. Во-первых, как свидетельствуют полученные результаты, в большей из используемых доз галоперидол защищал животных от повреждающего влияния полярных колебаний дофаминергической передачи (рис. 2А). В меньшей ( $0,1$  мг/кг), при этом препарат существенного влияния на выраженность катаlepsии не оказывал. Во-вторых, подкожное введение галоперидола нарушало период восстановления показателя катаlepsии. Это проявлялось в том, что последний в большей из использованных доз, снижал скорость восстановления феномена спонтанной катаlepsии (рис. 3) Статистически значимые отличия выявлены между группами 2 и 4 ( $p<0,04$ , тест Манна—Уитни).

Поскольку нарушение спонтанной катаlepsии, скорее всего, отражает уровень функционирования дофаминергической nigrostriatalной системы, а действие как фенамина, так и галоперидола активно в отношении всех дофаминергических систем мозга, то по изменению выраженности регистрируемого феномена можно косвенно судить об активности всех дофаминергических процессов ЦНС. Изменение показателя спонтанной катаlepsии в начале эксперимента у мышей 2-й группы можно расценивать как «терапевтическое» действие галоперидола в дозе  $0,25$  мг/кг, поскольку полученные результаты были сходны с показателями контрольных мышей 4-й группы и даже превосходили аналогичные значения контрольных мышей 3-й группы. Это, по всей видимости, могло быть связано с тем, что галоперидол в используемой дозе способен сглаживать резкие полярные колебания дофаминергической медиации центральных систем. Подобного эффекта не наблюдали при п/к введении меньшей из применяемых доз галоперидола.

В то же время, в той же «эффективной» дозе ( $0,25$  мг/кг, п/к) введение галоперидола приводило к замедлению восстановления феномена спонтанной катаlepsии (рис. 3), что отмечено по «запаздыва-

нию» восстановления спонтанной каталепсии к 10-м суткам регистрации. В меньшей из использованных доз (0,1 мг/кг п/к) введение галоперидола подобного эффекта не оказывало на динамику изменений спонтанной каталепсии.

Итак, если изменения выраженности феномена спонтанной каталепсии при поочередном введении фенамина и галоперидола рассматривать как отражение нейрохимических нарушений, то галоперидол способен оказывать защитное действие. Однако при этом он в эффективной дозе также нарушает процессы последующего восстановления активности дофаминергических процессов ЦНС.

Нам представляется, что полученные результаты вполне согласуются с клиническими эффектами, наблюдаемыми при использовании типичных нейролептиков у пациентов с хроническим прогрессивным психозом, например, при лечении шизофрении. То, что галоперидол, так же как и другие типичные антипсихотики, эффективно купирует основные симптомы психотического возбуждения, не вызывает никаких сомнений. Антипсихотический эффект этих препаратов связывают с блокадой дофаминергических процессов. Однако понятно, что активность дофаминергической передачи, определяющая не только появление психотической симптоматики (бред и галлюцинаций), но и непосредственно связанная с выполнением многих физиологических функций — контроль пищевого поведения, сексуальная активность, эмоциональные реакции, мотивационное поведение, когнитивные способности и пр., оказывается под влиянием антипсихотиков. Хорошо известно, что эти функции ЦНС страдают не только из-за прогрессивного течения болезни, но и вследствие применения лекарственных средств. Подобное действие антипсихотиков классифицируется в рамках развития вторичных негативных симптомов, большинство из которых ассоциировано с «негативными» симптомами (апатия, заторможенность, адинамия и др.) и недостаточностью нейрокогнитивного функционирования. Развитие подобных нарушений, формирующееся в результате течения патологического процесса, рассматривается в рамках первичных негативных симптомов и достигает максимальных проявлений, становясь необратимым при шизофреническом дефекте. Прогрессивность течения этих нарушений объясняется с позиций гипотезы «выгорания» дофаминчувствительных нейронов [11]. Известно, что усиление активности дофаминергической медиации приводит к развитию нейродегенеративных повреждений в ЦНС [7].

Антипсихотическая терапия в силу «антидофаминового» механизма действия препаратов способна также вызывать аналогичные негативные изменения мозговой деятельности сначала вследствие функциональных

изменений (снижением дофаминергической медиации), а затем, вероятно, и вследствие формирования органических поражений. В острой психотической ситуации препараты оказывают антипсихотическое и нейропротективное действие. Антипсихотики купируют симптомы психотического расстройства, а также защищают нейроны от перевозбуждения/«выгорания», блокируя локализующиеся на них дофаминергические рецепторы. В то же время, известно, что применение этих препаратов сопровождается компенсаторной активацией катехоламинергических процессов мозга и потому вслед за их внезапной или плановой отменой вероятен вторичный «взрыв» дофаминергической активности нейронов. Спровоцированная отменой дофаминовой гиперактивация может рассматриваться как фактор, провоцирующий эскалацию психоза и нейротоксичность. Таким образом, нарушение режима приема антипсихотиков (самовольные отмены), неоправданная смена препарата, преждевременная отмена или необоснованные комбинации создают предпосылки для прогрессивного течения болезни. С другой стороны, длительное применение антипсихотиков приводит к дисфункции дофаминергических систем и формированию тяжелых побочных явлений (поздняя дискинезия), а также снижению уровня нейрокогнитивного функционирования.

Безусловно, вопрос об адекватности применения антипсихотической терапии связан с выбором конкретного препарата, режима дозирования, продолжительностью курса лечения и особенностями течения заболевания (тяжестью острых психотических эпизодов, их продолжительностью и длительностью последующей ремиссии). Оценить влияние и удельный вес каждого из факторов для эффективности терапии и сохранности физиологических функций мозга крайне затруднительно.

Естественно, что приведенные в обсуждении соображения справедливы тогда, когда указанная патология рассматривается исключительно в рамках дофаминовой парадигмы формирования и терапии психотических состояний. Конечно же, автор отдаёт себе отчет в том, что подобные рамки созданы исключительно воображением, а *in situ* ситуация сложнее, она связана с вовлечением и серотониновых, и аминокислотергических, и иных (вероятно еще неизвестных) нейрохимических процессов в генез психотического возбуждения, а потому механизмы формирования психотических состояний и вопросы, связанные с выбором эффективной терапии нуждаются в разработке более изощренных экспериментальных методов моделирования подобных нарушений. Причем последние должны учитывать патокинез болезни с учетом прогрессивности течения, включая этап формирующейся недостаточности мозговых функций.

## Список литературы

1. **Козловский В.Л., Прахье И.В.** Влияние субхронического введения фенамина и галоперидола на развитие спонтанной катаlepsии у мышей // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2005. — №4. — С. 22—25.
2. **Минеева М.Ф.** Механизм действия нейролептиков // Итоги науки и техники, Молекулярные механизмы действия психотропных препаратов. — М., 1987. — Т. 15. — С. 170—228.
3. **Раевский К.С., Наркевич В.Б.** Экспериментальное доклиническое изучение специфической активности новых соединений, предлагаемых для клинических испытаний в качестве нейролептиков (антипсихотических средств): Методические рекомендации МЗ РФ. — М., 1998.
4. Способ моделирования психотического расстройства / Козловский В.Л., Патент РФ от 10.10.2009 г., №2366464, Бюл. №25.
5. **Щелкунов Е.Л.** Повышение тонуса центральных адренергических структур (высших симпатических центров) при хроническом введении нейролептиков // Психофармакология и лечение нервных и психических заболеваний: Сб. — Ленинград, 1964. — С. 23—25.
6. **Cohen B.M., Herschel M., Miller E., Maybery H.** Radioreceptor assay of haloperidol tissue levels in the rat // Neuropharmacol. — 1980. — 15, 5. — P. 663—669.
7. **Kelley A.E., Delfs J.M., Chu B.** Neurotoxicity induced by the D-1 agonist SKF 38393 following microinjection into rat brain // Brain Res. — 1990. — 532 (1—2). — P. 342—346.
8. **Olsen R. W., Liang J., Cagetti E., Spgelman I.** Plasticity of GABA<sub>A</sub> receptors in brains of rats treated with chronic intermittent ethanol Neurochem. Res. — 2005. — 30, №12. — P. 1579—1588.
9. **Schelkunov E.L.** Adrenergic effect of chronic administration of neuroleptics // Nature. — 1967. — 214. — 5094. — P. 1210—1212.
10. **Seiden L.S., Fishman M.W., Schuster C.R.** Long-term amphetamine-induced changes in brain catecholamines in tolerant rhesus monkeys // Drug Alcohol Dependens. — 1976. — 1. — P. 215—219.
11. **Stahl S.M.** Essential psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications. Second Edition. — Cambridge University Press, 2000. — 601 p.

Поступил 03.03.11



Т.И. Игнашкова, М.В. Меситов, А.С. Рыбаков, А.А. Московцев, А.А. Соколовская, А.А. Кубатиев

## **Депонирование фактора Виллебранда в эндотелиальных клетках человека HUVEC в условиях стресса эндоплазматического ретикулума, индуцированного избытком гомоцистеина, *in vitro***

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

*Фактор Виллебранда (ФВ) — гликопротеин, синтезируемый эндотелиальными клетками и мегакариоцитами. При характерной для гипергомоцистеинемии дисфункции эндотелия имеют место нарушения секреции ФВ эндотелиальными клетками. Проведенные нами исследования показали изменения внутриклеточного содержания фактора Виллебранда в культивируемых эндотелиальных клетках человека при действии избытка гомоцистеина *in vitro*. Первичную культуру эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) инкубировали с различными концентрациями D,L-гомоцистеина (0,025—5 мМ/л). Гомоцистеин в концентрации 0,025 и 0,25 мМ/л после 18 часовой инкубации вызывал увеличение содержания фактора в клетках HUVEC. Высокие концентрации гомоцистеина индуцировали дозо-зависимое снижение внутриклеточного уровня ФВ. Выявленные нами вариации дозо-зависимых ответов на гомоцистеин могут указывать на различные механизмы модуляции гомоцистеином комплекса процессов депонирования, конститутивной секреции и деградации ФВ в эндотелиоцитах человека. Стресс эндоплазматического ретикулума, идентифицированный нами в клетках HUVEC при действии избытка гомоцистеина, может сопровождаться ростом внутриклеточного уровня ФВ при сравнительно невысокой интенсивности воздействия. При той же продолжительности действия, но более высокой концентрации индуктора, регистрируется снижение уровня ФВ, которое может быть обусловлено ЭПР-стресс-ассоциированной деградацией.*

**Ключевые слова:** фактор фон Виллебранда, гомоцистеин, HUVEC, эндотелий

T.I. Ignashkova, M.V. Mesitov, A.S. Rybakov, A.A. Moskovtsev, A.A. Sokolovskaya, A.A. Kubatiev

## **Deposition of von Willebrand factor in human endothelial cells HUVEC in the endoplasmic reticulum stress induced by an excess of homocysteine *in vitro***

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

*Von Willebrand factor (vWF) is an adhesive glycoprotein synthesized and secreted by endothelial cells and megakaryocytes. Violation of vWF secretion by endothelial cells is a characteristic feature of endothelial dysfunction in hyperhomocysteinemia. In our study we examined to clarify the concentration-dependent effect of homocysteine (Hcy) on the expression of vWF. Our studies have shown that homocysteine excess induces changes in the intracellular deposition of von Willebrand factor in cultured human endothelial cells *in vitro*. Primary cultures of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were incubated with the various concentrations of D,L-homocysteine (0.025 — 5 mM/L). Homocysteine at a concentration of 0.025 and 0.25 mM / L after 18 h incubation caused an increase in the intracellular fraction of vWF in HUVEC cells. High concentrations of homocysteine induced a dose-dependent decrease in the intracellular fraction of vWF. These dose-dependent variations may indicate the modulation by homocysteine of different mechanisms of the deposition, the constitutive secretion and the degradation of vWF in human endothelial cells. We proposed that Endoplasmic reticulum stress, in HUVEC cells by the action of an excess of homocysteine associated with increased intracellular levels of vWF at a relatively low concentration of the inducer. We found decline in intracellular vWF at the same duration but higher concentrations of inducer, which may be due to the ER-associated protein degradation.*

**Key words:** Von Willebrand factor, homocysteine, HUVEC, endothelial cells

Сосудистый эндотелий продуцирует ряд физиологически важных соединений, к которым относится фактор Виллебранда (ФВ) [2] — сложный мульти-

мерный гликопротеин, ген которого расположен на хромосоме 12 (12p13.2) и включает в себя 52 экзона. Одной из важных функций ФВ является стабилизация и транспорт фактора VIII в составе комплекса [13].

Эндотелий, в зависимости от принадлежности к органу, а также звену сосудистого русла, различается

**Для корреспонденции:** Игнашкова Татьяна Игоревна, аспирант лаб. тромбозиса и тромбогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: tjanochka@gmail.com

по уровню продукции ФВ. В частности, в эндотелиоцитах сосудов легких, сердца, скелетных мышц выявлен сравнительно высокий уровень м-РНК ФВ, а в почках и печени — относительно низкий. ФВ также синтезируется мегакариоцитами.

Фактор Виллебранда депонируется в эндотелиальных клетках в специализированных секреторно-запасующих гранулах — так называемых тельцах Вейбеля—Палада (тВП) [2] с характерной палочкообразной формой, нетипичной для большинства внутриклеточных включений.

Известны два механизма секреции продуцируемого эндотелиальными клетками ФВ: конститутивный, направленный как в апикальную, так и базолатеральную стороны эндотелиального слоя; и индуцибельный, включающий в себя процессы упаковки и хранения фактора в тВП с последующим экзоцитозом в ответ на действие физиологических агонистов или травмы.

Индукцибельный путь ориентирован на рекрутирование тромбоцитов. Наиболее задействованы в процессах гемостаза высокомолекулярные полимеры фактора. Большая часть образующихся в эндотелии мультимеров ФВ депонируется в тВП. В ответ на действие агонистов, индуцирующих рост уровней вторичных посредников ( $Ca^{2+}$  или цАМФ), происходит экзоцитоз тВП в базолатеральном направлении, что приводит к увеличению содержания крупных мультимеров ФВ во внеклеточном матриксе [14]. Такая уникальная полярность и однонаправленность экзоцитоза может нарушаться при физическом повреждении эндотелия — мультимеры ФВ секретируются и в плазму, и во внеклеточный матрикс (подэндотелиальный слой).

Рост концентрации ФВ в крови может указывать на возможные повреждения эндотелия и наличие сосудистых заболеваний [3, 9], уровень ФВ предложен в качестве показателя эндотелиальной дисфункции [8]. Многие патологии, такие, как сахарный диабет, атеросклероз, онкологические заболевания, сопровождаются острыми и хроническими повреждениями эндотелия, приводящими к повышению уровня ФВ в крови [1, 5]. Однако увеличение ФВ может наблюдаться и в физиологических условиях, в частности, после физической нагрузки. При гипотиреозидизме и системной красной волчанке концентрация ФВ, наоборот, снижена.

Патологическое состояние гипергомоцистеинемии, характеризующееся повышением уровня гомоцистеина в плазме крови, также ассоциировано с эндотелиальной дисфункцией. Было отмечено, что гомоцистеин ингибирует выработку и высвобождение ФВ из эндоплазматического ретикула эндотелиальных клеток [6]. Вместе с тем, данные литературы о внутриклеточном содержании ФВ в эндотелиальных клетках при действии избытка гомоцистеина противоречивы.

Ряд данных указывает на возможность существования дополнительных механизмов, влияющих на внутриклеточное депонирование и секрецию ФВ эндотелиоцитами при гипергомоцистеинемии.

*Цель исследования* — изучение процесса внутриклеточного депонирования ФВ и анализ общего его содержания в культивируемых эндотелиоцитах человека *in vitro*.

## Методика

### Культура клеток

Первичную культуру эндотелиальных клеток вены пуповины человека (HUVES — human umbilical vein endothelial cells) изолировали из препаратов пупочной вены человека обработкой коллагеназой. Эндотелиоциты HUVES культивировали в среде 199 с солями Эрла (Gibco, США), содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки (Gibco, США), фактора роста эндотелиальных клеток (Gibco, США) и антибиотика (Gentamicin, Gibco, США) при 37°C в атмосфере 5%  $CO_2$ . В экспериментах использовали клетки 2—4 пассажей.

Полученную первичную культуру иммунофенотипировали с целью оценки экспрессии клетками маркеров, характерных для эндотелиоцитов. Для измерения экспрессии поверхностных клеточных маркеров методом проточной цитометрии клетки отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и инкубировали с моноклональными антителами анти-CD34-FITC, анти-CD31-FITC, анти-CD105-FITC (BD Biosciences, США) 1 час, повторно отмывали для минимизации неспецифического мечения, ресуспендировали в ФСБ, содержащем 1%-ный раствор параформальдегида.

Для исследования влияния гомоцистеина на внутриклеточный пул ФВ клетки HUVES в концентрации  $5 \times 10^5$  в 1 мл культивировали в присутствии различных концентраций D,L-гомоцистеина (Sigma, St Louis, США) (0,025—5 мМ/л) в течение 18 ч. Для детектирования ФВ была использована непрямая реакция иммунофлюоресценции с последующим анализом при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа (ЛКСМ) и метода проточной цитофлюориметрии (ПЦФМ). ЛКСМ в данной работе использовалась нами для исследования внутриклеточных дискретных включений ФВ, в частности, их количества, размера, морфологии, ПЦФМ — для анализа распределения клеток по величине внутриклеточного уровня ФВ.

### Иммуноцитохимия

Клетки HUVEC рассеивали в 6-луночный планшет на покровные стекла, обработанные 0,1% коллагеном. После инкубации в присутствии различных концентраций Hcy (0,025—5,0 мМ/л), клетки фиксировали 4% параформальдегидом, пермеабилizировали 0,01% Тритон X-100 и блокировали 3% БСА (бычьим сывороточным альбумином). После чего клетки окрашивали первичными поликлональными антителами к ФВ (anti-Von Willebrand Factor, Abscam, Великобритания) и вторичными родамин-мечеными антителами (KPL, США). Визуализация субклеточной локализации ФВ проводилась при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа ECLIPSE TE2000U (Nikon, Япония) с использованием программного обеспечения EZ версии 2.3.

Для измерения внутриклеточной экспрессии ФВ клетки HUVEC фиксировали в 0,01% формальдегиде в течение 15 мин. Пермеабилizацию клеточной мембраны осуществляли ФСБ, содержащим 0,1% сапонин в течение 10 мин. После чего клетки отмывали и инкубировали с первичными поликлональными антителами к ФВ (Abscam, Англия) 1 час, затем инкубировали с ФИТЦ-мечеными вторичными антителами (KPL, США).

Перед измерением методом проточной цитометрии клетки HUVEC диссоциировали при помощи трипсина (0,25%) с ЭДТА при 37°C в течение 5 мин.

Сбор и анализ данных проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, США) с аргоновым лазером (длина волны 488 нм) с использованием программного обеспечения CELLQuest. В каждом образце анализировали не менее 10000 событий. Эмиссию флуоресценции (FITC) регистрировали в канале FL1 (515—545 нм). Изотип-специфические FITC-меченные антитела были использованы как контроль.

### Обработка изображений

Для оценки морфологических изменений телец Вейбеля—Палада полученные методом ЛКСМ изображения подвергались бинаризации с последующей процедурой анализа частиц с помощью программного обеспечения ImageJ 1.45s (NIH, США). Затем рассчитывались отношения больших и малых осей эллипсов, использованных в качестве фигур аппроксимации. Эти отношения, полученные для каждого изображения, подвергались статистическому анализу.

Статистическая обработка данных, собранных методом проточной цитометрии, проводилась с помощью критерия Колмогорова—Смирнова, а остальных результатов — с помощью однофакторного дисперсионного анализа и критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Проведенное иммуноцитохимическое исследование (рис. 1) показало, что инкубация клеток с избытком гомоцистеина модулирует морфологию телец ВП, содержащих ФВ. Морфометрически (рис. 2) было обнаружено уменьшение отношения продольных размеров гранул к поперечным для концентраций гомоцистеина 0,25 мМ/л ( $p=0,0136$ ) и 2,5 мМ/л ( $p=0,0096$ ).

В препаратах визуализированных с помощью ЛКСМ клеток HUVEC, инкубированных с 5 мМ/л гомоцистеина 18 ч, наблюдалась тенденция к снижению суммарной интенсивности флуоресценции ФВ по сравнению с контролем. Результаты исследований, полученные методом проточной цитометрии, показали, что малые и средние концентрации гомоцистеина 0,025 и 0,25 мМ/л вызывали увеличение уровня внутриклеточного ФВ.

При концентрации 0,025 и 0,25 ммоль/л процент клеток, превышающих установленное значение интенсивности флуоресценции, ассоциированной с ФВ, увеличивался до 24 и 44% соответственно, тогда как контрольный уровень ФВ составлял в среднем 16% (рис. 3). При высоких концентрациях гомоцистеина процент таких клеток снижался до 15 и 6% для концен-

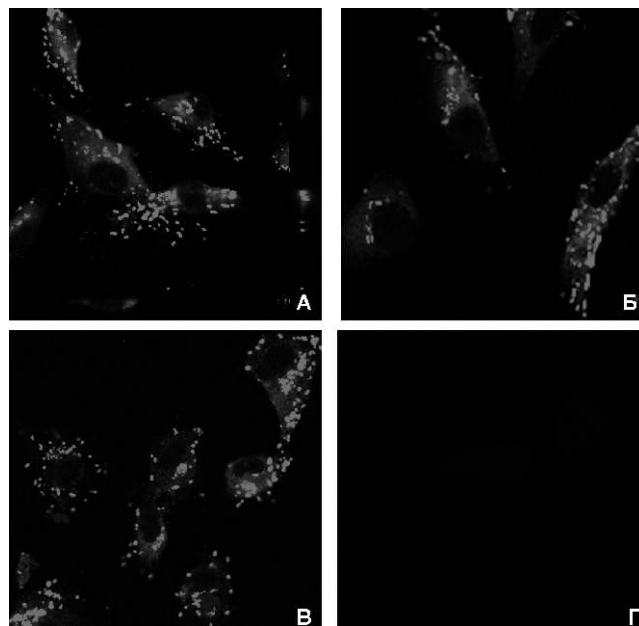


Рис. 1. Внутриклеточное депонирование ФВ в эндотелиальных клетках человека HUVEC. Клетки HUVEC инкубировали в 6-луночном планшете на покровных стеклах в присутствии гомоцистеина 18 ч. После инкубации клетки фиксировали, пермеабилizовали и инкубировали с поликлональными антителами к фактору вон Виллебранда: А — контрольные клетки без добавления гомоцистеина; Б—В — клетки в присутствии гомоцистеина: Б — Hcy 0,25 мМ/л; В — Hcy 2,5 мМ/л; Г — изотипический контроль — клетки, инкубированные только мечеными родамином антителами

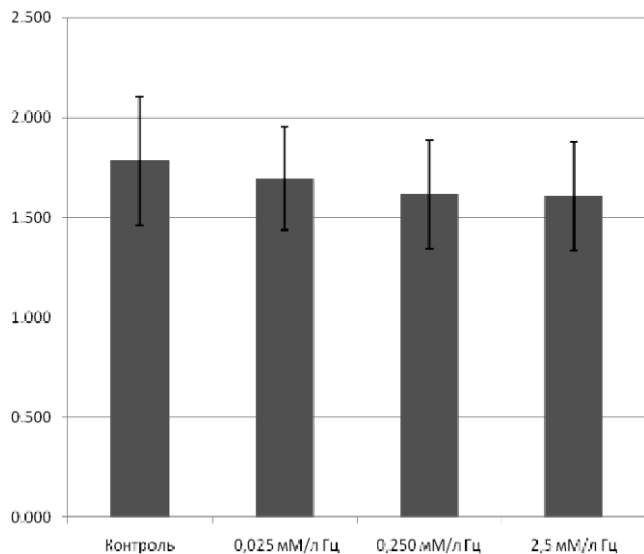


Рис. 2. Отношение продольных к поперечным размерам гранул, меченных антителами к ФВ в клетках HUVEC, инкубированных с избытком гомоцистеина. Изображения, полученные методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, подвергали процедуре бинаризации с последующим анализом частиц с помощью программного обеспечения ImageJ 1.45s (NIH, США), после чего рассчитывали отношения больших и малых осей аппроксимирующих эллипсов

траций 2,5 и 5 ммоль/л соответственно. На рис. 3Б представлены примеры гистограмм, иллюстрирующих распределение клеток, инкубированных в присутствии гомоцистеина, по интенсивности флуоресценции. Интересно, что для концентрации гомоцистеина 0,25 мМ/л наблюдается уширение пика — характер распределения клеток напоминает скорее бимодальный. Это наблюдение, по-видимому, может указывать на гетерогенность эндотелиоцитов по внутриклеточному уровню ФВ — т.е. наличие субпопуляции с относительно высоким содержанием ФВ и клеток с уровнем ФВ, близким к контрольным значениям.

Для анализа возможных изменений в секреторном пути эндотелиоцитов при действии избытка гомоцистеина нами было проведено исследование экспрессии ЭПР-резидентных белков в эндотелиоцитах HUVEC методом иммуноцитохимии с применением моноклональных антител, специфичных к сигналу KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) локализации в ЭПР. Наиболее представленными белками ЭПР с такими сигналами являются шапероны HSPA5 (GRP78, или BiP), HSP90B1 (GRP94), белки семейства протеиндисульфизомераз (PDI). Повышение экспрессии этих белков ассоциировано со стрессом эндоплазматического ретикулума и индукцией адаптивного каскада — ответа на белки с ненативными конформациями — UPR (Unfolded Protein Response). Проведенное нами исследование методом ЛКСМ с 3D-реконструкцией (рис. 4, 5) показало, что гомоцистеин в концентрации 0,25 мМ/л

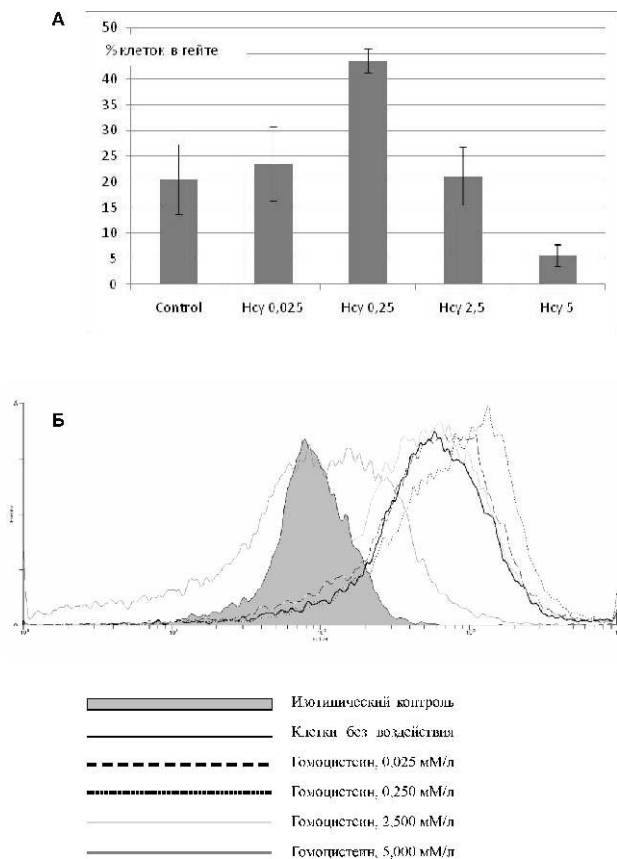
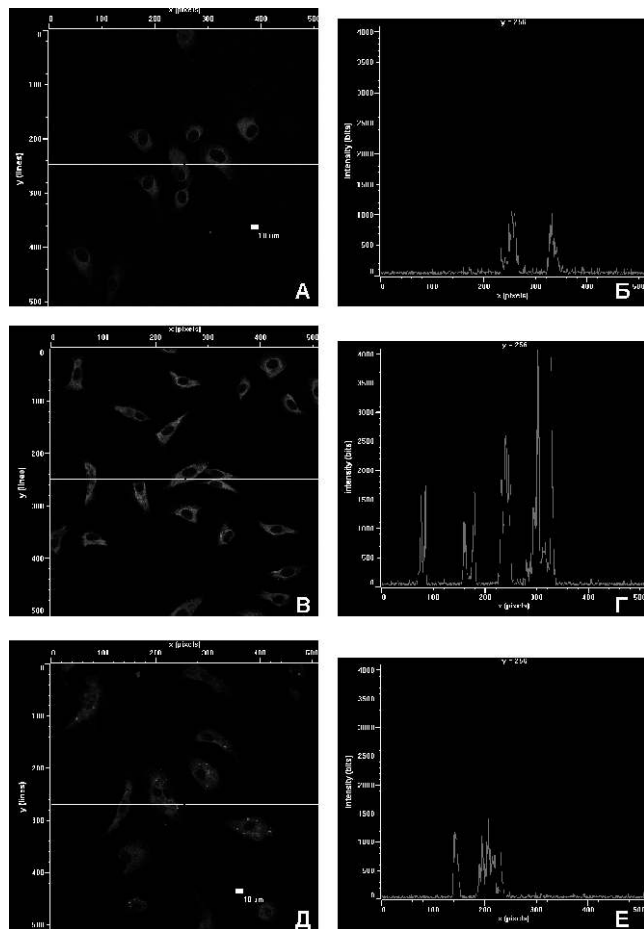


Рис. 3. Изменение внутриклеточного уровня ФВ под влиянием различных концентраций гомоцистеина. Культуру клеток HUVEC инкубировали в присутствии гомоцистеина в диапазоне концентраций 0,025–5 мМ/л в течение 18 ч. После чего клетки снимали с подложки при помощи трипсина с ЭДТА и фиксировали в 0,01% формальдегиде, пермеабелизовали 0,1% сапонином. Затем клетки отмывали и инкубировали с первичными поликлональными антителами к ФВ (Abscam, UK) 1 ч и ФИТЦ-мечеными вторичными антителами (KPL, USA) 30 мин. Сбор данных и анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur: А — процент клеток в гейте; Б — однопараметрические гистограммы

вызывает увеличение экспрессии шаперонов ЭПР, при концентрации 5 мМ/л наблюдались признаки перераспределения шаперонов в везикулы. Полученные данные позволяют предположить, что избыток гомоцистеина индуцирует ЭПР-стресс. В клетках, инкубированных с высокими концентрациями гомоцистеина, визуализируются гранулы с высокой концентрацией шаперонов — основываясь на полученных данных и данных литературы, можно предположить, что в клетках развиваются процессы протеасомной деградации (ERAD).

В ряде работ [6, 10] было показано, что гомоцистеин в концентрации 3–5 мМ/л вызывает значительное увеличение внутриклеточного содержания ФВ. Результаты экспериментов, проведенных нами с использованием проточной цитометрии и ЛКСМ, показали, что гомоцистеин в концентрации 0,025 и



**Рис. 4.** Экспрессия ЭПР-резидентных белков с сигналом локализации KDEL в эндотелиоцитах HUVEC, инкубированных с избытком гомоцистеина, ЛКСМ: микрофотографии (А, В, Д) и соответствующие гистограммы (Б, Г, Е): А, Б — контроль, 18 ч без воздействия; В, Г — гомоцистеин 0,25 мМ/л, 18 ч; Д, Е — гомоцистеин 2,5 мМ/л, 18 ч

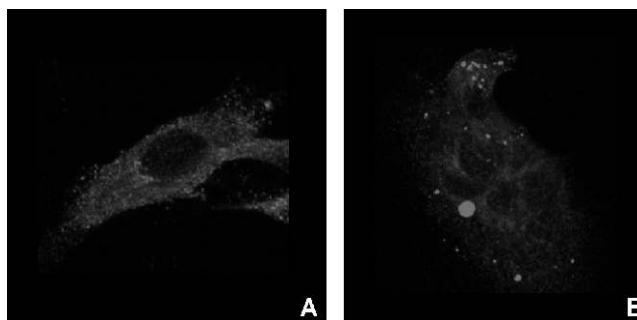
0,25 мМ способствует росту уровня внутриклеточного ФВ, инкубация с ГЦ в концентрации 2,5 и 5 мМ/л уменьшает содержание внутриклеточного ФВ. При инкубации с избытком гомоцистеина изменяется форма и количество телец Вейбеля—Палада.

Проведенные нами иммуноцитохимические исследования показали, что избыток гомоцистеина индуцирует стресс ЭПР в эндотелиоцитах HUVEC, что согласуется с работами других исследователей. Снижение внутриклеточного уровня ФВ в HUVEC происходит на фоне существенного увеличения экспрессии шаперонов ЭПР — маркеров ЭПР стресса. По-видимому, падение уровня ФВ может быть ассоциировано с повышением протеасомной деградации в условиях нарушенного процесса конформационного созревания белков в ЭПР.

Продуктом трансляции 8,7 кб мРНК ФВ является полипептид ргегро-*v*WF, состоящий из 2813 аминокис-

лотных остатков, из которых 22 представляют собой сигнальный пептид, 741 а.о. — так называемый пропептид, оставшиеся 2050 а.о. соответствуют зрелой субъединице с массой около 278 кДа [14]. Субъединицы рго-*v*WF димеризуются в эндоплазматическом ретикулуме через образование дисульфидных связей между С-концами. Гликозилированные в ЭПР рго-*v*WF димеры затем поступают в комплекс Гольджи, где при характерном рН (6,2 в отличие от рН в ЭПР 7,4) формируются «димерные букеты» и затем уже межсубъединичные дисульфидные связи между N-концевыми участками димеров («голова-к-голове») (16). То есть, таким образом, происходит мультимеризация димеров — инициализируется сборка N-концевых доменов в спиральную трубку тельца Вейбеля—Палада (16). Для описанного процесса сшивки N-концов необходимо наличие пропептида, домены которого D1 и D2 включают в себя мотивы (последовательности) СХХС, характерные для оксидоредуктаз, участвующих в образовании и/или изомеризации дисульфидных связей. Считается, что пропептид обладает оксидоредуктазной активностью, результатом которой становятся мультимерные комплексы *v*WF, состоящие из более 40 субъединиц с общей массой свыше 20 000 кДа и сопоставимые по размерам с тромбоцитами (около 4 мкм) [14].

Таким образом, при синтезе мультимерных комплексов ФВ и последующем их депонировании в тВП имеют место два пространственно разделенных процесса образования дисульфидных связей — при образовании димеров в ЭПР и мультимеров в комплексе Гольджи. Наблюдавшееся нами уменьшение продольных размеров тВП может указывать, по-видимому, на нарушение процесса полимеризации ФВ в присутствии избытка гомоцистеина. Гомоцистеин, как показали мы и ряд других авторов, в эндотелиальных клетках индуцирует стресс эндоплазматического ретикулума — по-видимому, этот процесс обусловлен нарушением образования дисульфидных связей в люмене ЭПР. Наши наблюдения указывают на возможность того, что избыток



**Рис. 5.** Экспрессия ЭПР-резидентных белков с сигналом локализации KDEL в эндотелиоцитах HUVEC, инкубированных с избытком гомоцистеина, ЛКСМ, 3D-реконструкция: А — гомоцистеин 0,25 мМ/л, 18 ч; Б — гомоцистеин 5 мМ/л, 18 ч

ГЦ может влиять и на процесс образования дисульфидных связей при мультимеризации, причем это может иметь место при концентрациях ГЦ, существенно меньших тех, которые ассоциированы с пиковым ЭПР-стрессовым ответом. Обращает на себя внимание обнаруженное нами увеличение содержания в клетках ФВ при инкубации с гомоцистеином в диапазоне концентраций до 0,25 мМ/л. Можно предложить несколько возможных объяснений этому — увеличение продукции ФВ, снижение базального экзоцитоза. Для стресса ЭПР характерен блок трансляции, снижение скорости поступления полипептидных цепей в люмену ЭПР и синтез белка ЭПР-ассоциированными рибосомами. Это, по-видимому, не соответствует предположению о возможном увеличении продукции ФВ. Предполагаемая модуляция гомоцистеином экзоцитоза в эндотелиоцитах вызывает определенный интерес в связи с недавним исследованием (15), предполагающим наличие редокс-активных пар цистеина в нейрональном белке SNARE-25 — гомологе распространенного в клетках белка SNARE-23, участвующего в процессе «причаливания» везикул, в том числе экзоцитозных, к мембранам клетки. Для уточнения механизмов, лежащих в основе данного явления, требуется проведение дополнительных исследований.

### Список литературы

1. **Spiel A.O., Gilbert J.C., Jilma B.** von Willebrand factor in cardiovascular disease: focus on acute coronary syndromes // *Circulation*. — 2008. — 117. — P. 1449–1459.
2. **Giblin J.P., Hewlett L.J., Hannah M.J.** Basal secretion of von Willebrand factor from human endothelial cells // *Blood*. — 2008. — 112. — P. 957–964.
3. **Lip G.Y., Blann A.** von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders? // *Cardiovascular Research*. — 1997. — 34. — P. 255–265.
4. **Griendling K.K., Alexander R.W.** Oxidative stress and cardiovascular disease // *Circulation*. — 1997. — 96. — P. 3264–3265.

5. **Jakubowski H.** Pathophysiological Consequences of Homocysteine Excess // *J. Nutrition*. — 2006. — 136. — P. 1741S–1749S.

6. **Lentz S.R., Sadler J.E.** Homocysteine Inhibits von Willebrand Factor Processing and Secretion by Preventing Transport From the Endoplasmic Reticulum // *Blood*. — 1993. — Vol. 81. — P. 683–689.

7. **Pusztaszeri M.P., Seelentag W., Bosman F.T.** Bosman Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. — 2006. — Vol. 54(4). — P. 385–395.

8. **Outinen P.A., Sood S.K., Pfeifer S.I., Pamidi S., Podor T.J., Li J., Weitz J.I., Austin R.C.** Homocysteine-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Growth Arrest Leads to Specific Changes in Gene Expression in Human Vascular Endothelial Cells // *Blood*. — 1999. — Vol. 94 (3). — P. 959–967.

9. **Mannucci P.M.** von Willebrand Factor: A Marker of Endothelial Damage? // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 1998. — 18. — P. 1359–1362.

10. **Roybal C.N., Yang S., Sun C.W., Hurtado D., Vander Jagt D.L., Townes T.M., Abcouwer S.F.** Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4 // *J. Biol. Chem.* — 2004. — Apr. 9. — 279(15). — P. 14844–14852.

11. **Tawakol A., Forgiione M.A., Stuehlinger M., Alpert N.M., Cooke J.P., Loscalzo J., Fischman A.J., Creager M.A., Gewirtz H.** Hyperhomocysteinemia is associated with impaired endothelium — dependent vasodilation function in humans // *Circulation*. — 1997. — 95. — P. 1119–1121.

12. **Vane J.R., Anggard E.E., Batting R.M.** Regulatory functions of the vascular endothelium // *New England Journal of Medicine*. — 1990. — 323. — P. 27–36.

13. **Vanhoutte P.M., Mombouli J.V.** Vascular endothelium: vasoactive mediators // *Prog. Cardiovasc. Dis.* — 1996. — 39. — P. 229–238.

14. **Aird W.C.** (ed.) *Endothelial Biomedicine*. — Cambridge University Press, 2007.

15. **Bock L.V., Hutchings B., Grubmuller H., Woodbury D.J.** Chemomechanical Regulation of SNARE Proteins Studied with Molecular Dynamics Simulations // *Biophysical Journal*. — 2010. — 90. — P. 1221–1230.

16. **Springer T.A.** Biology and physics of von Willebrand factor concatamers // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. — 2011. — 9 (Suppl. 1). — P. 130–143.

Поступила 23.04.12

### Сведения об авторах:

**Игнашкова Татьяна Игоревна**, аспирант лаб. молекулярных механизмов тромбогенеза и тромболизиса ФГБУ НИИОПП РАМН

**Меситов Михаил Валентинович**, аспирант лаб. молекулярных механизмов тромбогенеза и тромболизиса ФГБУ НИИОПП РАМН

**Рыбаков Антон Станиславович**, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБУ НИИОПП РАМН

**Московцев Алексей Александрович**, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. молекулярных механизмов тромбогенеза и тромболизиса ФГБУ НИИОПП РАМН

**Соколовская Алиса Анатольевна**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. функциональной геномики и липидомики ФГБУ НИИОПП РАМН

**Кубатиев Аслан Амирханович**, д-р мед. наук, проф., акад. РАМН, директор ФГБУ НИИОПП РАМН

М.В. Меситов, Т.И. Игнашкова, М.Е. Мещерский,  
А.С. Акопов, А.А. Соколовская, А.А. Московцев, А.А. Кубатиев

## **Индукция стресса эндоплазматического ретикулума в условиях окислительно-восстановительного дисбаланса в клетках Т-лимфобластной лейкемии человека**

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

*Стресс ЭПР — типовой молекулярно-патофизиологический процесс, лежащий в основе многих сердечно-сосудистых, эндокринных и других заболеваний. Нарушения процессов конформационного созревания белков в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) могут индуцировать протеотоксический стресс. Активированные компенсаторные механизмы в ответ на нарушение фолдинга белков в ЭПР включают в себя рост экспрессии ферментов, участвующих в образовании дисульфидных связей в белках. Продуктом окисления сульфгидрильных групп белков являются активные формы кислорода (АФК). Увеличение активности оксидоредуктазы ERO1 может быть одним из механизмов развития окислительного стресса — однако, источник АФК при стрессе ЭПР и связь гиперпродукции АФК со стрессом ЭПР остаются предметом дискуссий. В данном исследовании показано, что индуцируемое дитиотрейтолом (ДТТ) нарушение окислительно-восстановительного баланса, сопровождаемое падением продукции АФК, приводит к развитию стресса эндоплазматического ретикулума в клетках Jurkat. Стресс ЭПР в этих клетках не ассоциирован с повышением продукции АФК, воздействие ДТТ приводит к индукции апоптоза. Гомоцистеин, индуцирующий в эндотелиоцитах стресс ЭПР, для Jurkat не является эффективным индуктором стресса ЭПР в исследованном диапазоне концентраций. Таким образом, при ДТТ-индуцированном стрессе ЭПР в клетках Jurkat продукция АФК не повышена, однако, для других типов клеток генерация АФК при стрессе ЭПР может являться в определенной степени адаптивным процессом с учетом возможного участия АФК в образовании дисульфидных связей белков протеома, включая белки в эндоплазматическом ретикулуме.*

**Ключевые слова:** стресс эндоплазматического ретикулума, дитиотрейтол, активные формы кислорода, фолдинг белков, оксидоредуктаза ERO1, дисульфидные связи белков

M.V. Mesitov, T.I. Ignashkova, M.E. Mesherkiy, A.S. Akopov,  
A.A. Sokolovskaya, A.A. Moskovtsev, A.A. Kubatiev

## **Redox imbalance with low ros production is associated with er stress in Jurkat cells**

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

*Endoplasmic reticulum stress — typical molecular pathophysiological process that underlies many cardiovascular, endocrine and other diseases. Violations of the protein conformational maturation processes in the endoplasmic reticulum can cause proteotoxic stress. Compensatory mechanisms are activated in response to ER stress include increased expression of enzymes involved in the formation of disulfide bonds in proteins. The sulfhydryl groups oxidation in the electron transport chain (PDI-ERO1-O<sub>2</sub>) is associated with reactive oxygen species (ROS) generation. Increased activity of oxidoreductase ERO1 could be one of the mechanisms of oxidative stress — however, a direct relationship of ER stress with the overproduction of ROS remains a subject of debate. In this study we have shown that induced by dithiothreitol (DTT) violation of the redox balance with low ROS production leads to the endoplasmic reticulum stress in Jurkat cells. ER-stress in these cells is not associated with increased ROS production, DTT treatment leads to induction of apoptosis. Modulation of intracellular levels of ROS can influence the apoptosis-inducing effects of ER-stress. Given the possible involvement of ROS in the generation of disulfide bonds, the role of ROS in ER stress may be a modulation of disulfide proteome including client proteins.*

**Key words:** endoplasmic reticulum stress, dithiothreitol, reactive oxygen species, proteins folding, oxidoreductase ERO1, disulfide bonds in proteins

**Для корреспонденции:** Меситов Михаил Валентинович, аспирант лаб. молекулярных механизмов тромбогенеза и тромболитизиса ФГБУ НИИОПТ РАМН. E-mail: geliopolit@yandex.ru

Около 30% белков эукариот, в том числе большинство секреторных, синтезируется на рибосомах шероховатого эндоплазматического ретикула (ЭПР) и приобретает нативную конформацию в люмене эндоплазматического ретикула [2]. «Качество» белковых конформаций контролируется системой ERQC (Endoplasmic Reticulum Quality Control).

Одной из особенностей ассоциированного с трансляцией (котрансляционного) фолдинга белков в ЭПР является образование дисульфидных связей. Доминирующим у эукариот механизмом формирования дисульфидных связей в белках является совместное действие ферментов семейства протеиндисульфоизомераз (PDI), осуществляющих окисление сульфгидрильных групп, изомеризацию, восстановление дисульфидных связей b оксидоредуктаз Ero-1 (тканеспецифичные изоформы Ero-1- $\alpha$  и Ero-1- $\beta$  у человека), окисляющих протеиндисульфоизомеразы.

Молекулярный кислород в аэробных условиях является конечным акцептором электронов, полученных ферментами PDI и переданных Ero-1 у эукариот [13,14]. Формируемая таким образом цепь переноса электронов является ключевым элементом системы окислительного фолдинга [10]. Считается, что процесс образования дисульфидных связей влечет за собой существенную генерацию АФК — вплоть до 25% от общего количества АФК, продуцируемого клеткой [8].

Нарушения процессов конформационного созревания белков могут стать причиной развития протеотоксического стресса, динамика которого определяется интенсивностью *de novo* синтеза и обновления клеточных и экстраклеточных белков. Продукты незаконченной трансляции, интермедиаты фолдинга с некорректной конформацией, а также субъединицы, не включенные в олигомерные белковые комплексы, могут экспонировать гидрофобные области [6], которые становятся дополнительными, «незаконными» интерфейсами для межмолекулярного взаимодействия и могут приводить к агрегации белков, формированию токсичных и иммуногенных продуктов. Накопление конформационно-дефектных белков в люмене ЭПР в связи со множественностью функций и единым объемом этого компартмента может инициировать дисфункции других систем ЭПР, и тем самым индуцировать общее состояние ЭПР, характеризующееся как стресс эндоплазматического ретикула.

Стресс ЭПР — типовой молекулярно-патфизиологический процесс, лежащий в основе многих сердечно-сосудистых, эндокринных и других заболеваний. В частности, дисфункция эндотелия при гипергомоцистеинемии может быть обусловлена индуцируемым избытком гомоцистеина стрессом ЭПР и IRE1-зависимым апоптозом [16]. Нарушения конформационного созревания белков, ЭПР-стресс и окислительный стресс играют важную роль в патогенезе

незе нейродегенеративных заболеваний, таких, как болезнь Альцгеймера и Паркинсона [8].

Для защиты от протеотоксического стресса и ошибок работы системы конформационного созревания белков в ЭПР эукариот возникли следующие приспособления:

- рецепция белков с нарушенными конформациями в эндоплазматическом ретикуле;
- обработка и передача информации в ядро о детектированных белках с дефектными или незрелыми конформациями;
- адаптационные изменения ЭПР и ассоциированных структур, общим результатом действия которых должно стать снижение концентрации дефектных белков в люмене ЭПР.

Перечисленные функции реализуются посредством нескольких механизмов, действующих зачастую совместно:

- система сигнальных каскадов ответа на белки с ненативными конформациями (Unfolded Protein Response, UPR);
- контроль трансляции — аттенуация кэп-зависимой трансляции, опосредуемая киназой PERK;
- активация транскрипционного фактора ATF6;
- ответ на избыток белка в люмене ЭПР, или «перегрузку» ЭПР (endoplasmic reticulum overload response, EROR), опосредуемый активированным транскрипционным фактором NF- $\kappa$ B.

Активированные компенсаторные механизмы в ответ на нарушение фолдинга белков в люмене ЭПР включают в себя рост экспрессии ферментов, участвующих в образовании дисульфидных связей в белках. Увеличение активности оксидоредуктазы Ero1 может приводить к росту продукции АФК [13]. Считается, что это может быть одним из механизмов развития окислительного стресса — однако, источник АФК при стрессе ЭПР и связь гиперпродукции АФК со стрессом ЭПР остается предметом дискуссий.

На фоне большого количества исследований, посвященных стрессу ЭПР в профессиональных секреторных клетках, значительно меньшее внимание уделяется клеткам, не синтезирующим значительное количество белка на экспорт. Цель работы — исследование особенностей течения стресса эндоплазматического ретикула и ассоциации его с генерацией АФК в линии клеток Т-лимфобластной лейкемии Jurkat.

## Методика

### Культивирование клеток

Суспензионные клетки Jurkat культивировали на среде RPMI1640 (Gibco, Invitrogen Corporation) с 10% FBS (Gibco, Invitrogen Corporation) в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Пересев производили с плотностью 5,0×10<sup>5</sup> клеток/мл. Подсчет клеток производили на автоматическом счетчике клеток фирмы InvitroGen Countess.



*Иммуноцитохимия*

После инкубации в присутствии различных концентраций дитиотрейтола (ДТТ) и гомоцистеина, клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом, пермеабилizировали 0,01%-ным раствором Тритон X-100 и блокировали 3%-ным раствором БСА (бычьим сывороточным альбумином). Затем клетки инкубировали с первичными моноклональными антителами к белкам с пептидом KDEL (Abcam, Великобритания) и вторичными родамин-мечеными антителами (KPL, США). Визуализацию локализации проводили при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа ECLIPSE TE2000U (Nikon, Япония) с использованием программного обеспечения EZ версии 2.3.

*Иммуноблоттинг*

Белки разделяли электрофорезом в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях, переносили на мембрану PVDF (поливинилиден дифлуорид), после чего блокировали в растворе 5% сухого молока. Инкубировали с первичными анти-KDEL антителами, приготовленными в разведении 1:1000, в течение 1 ч, затем со вторичными козыми анти-мышинными антителами, мечеными пероксидазой хрена, разведенными 1:3000 также в течение 1 ч. Белки визуализировали на станции геле-документирования Kodak Image Station 440CF.

*Детектирование активных форм кислорода*

Для определения уровня продукции АФК использовали дихлорофлуоресцеиндиацетат  $H_2DCFDA$  (Invitrogen Corp.) — почти не флуоресцирующее соединение, легко проникающее через клеточную мембрану в клетку и гидролизующееся внутриклеточными эстеразами до 2',7'-дихлорофлуоресцеина (DCFH). Также не флуоресцирующее соединение DCFH, в свою очередь, окисляется реактивными формами кислорода до 2',7'-дихлорофлуоресцеина (DCF) с высоким уровнем флуоресценции.

В качестве положительного контроля использовали клетки, инкубированные 30 мин с пероксидом водорода в конечной концентрации 10 мМ, отрицательного — клетки с добавленным эквивалентным объемом воды. Зонд  $H_2DCFDA$  использовался в концентрации 4 мкМ/л. Клетки с зондом инкубировали 30 мин, затем однократно отмывали PBS, после чего с помощью проточной цитометрии детектировали флуоресценцию DCF при длине волны возбуждения 485 нм и длине волны эмиссии 535 нм.

*Проточная цитометрия*

Сбор и анализ данных проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с аргонным лазером (длина волны 488 нм) с использованием программного обеспечения CELLQuest. В каждом образце анализировали не менее 10000 событий.

**Результаты и обсуждение***Экспрессия белков с сигналом локализации KDEL при действии ДТТ и гомоцистеина*

Для анализа изменений в клетках Jurkat при действии индуктора ДТТ было проведено исследование экспрессии ЭПР-резидентных белков методом иммуноцитохимии с применением моноклональных антител, специфичных к пептиду KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) — сигналу локализации в ЭПР. Среди белков с сигналом KDEL в ЭПР преобладают шапероны HSPA5 (GRP78, или BiP), HSP90B1 (GRP94), белки семейства протеиндисульфизомераз (PDI). Повышение экспрессии этих белков является элементом адаптивного каскада — ответа на белки с ненативными конформациями — UPR (Unfolded Protein Response), индукция которого ассоциирована со стрессом эндоплазматического ретикула.

С помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии клеток Jurkat, инкубированных в ростовой среде с добавлением индуктора ДТТ в течение 18 ч, было детектировано шестикратное увеличение интенсивности флуоресценции, что может свидетельствовать о повышении экспрессии KDEL-содержащих белков (рис. 1).

В предыдущих работах нами и рядом других авторов [11] показано, что избыток гомоцистеина также способен индуцировать стресс ЭПР, в частности, в эндотелиоцитах человека. Инкубация клеток Jurkat с гомоцистеином в концентрации, вызывающей стрессорный ответ в клетках HUVEC, не приводило к существенному росту экспрессии KDEL-содержащих белков у Jurkat. Проведенная оценка экспрессии методом вестернблот подтверждает детектированное методом АСКМ увеличение концентрации белков ЭПР с сигналом локализации в ЭПР при действии ДТТ. Необходимо отметить, что гетерогенность клеток Jurkat по экспрессии KDEL-белков в контроле без воздействия ниже, чем при индукции стресса. Как видно из рис. 1 В, стрессированные клетки могут существенно отличаться по экспрессии белков ЭПР, участвующих в адаптивном ответе.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об увеличении экспрессии KDEL-содержащих белков в клетках Jurkat при их инкубации в среде, содержащей 2,5 мМ/л ДТТ. С учетом уровня экспрессии указанных белков, можно говорить об умеренной индукции стресса эндоплазматического ретикула в этих клетках.

*Генерация АФК**при действии ДТТ и гомоцистеина*

Для анализа генерации АФК при стрессе эндоплазматического ретикула применяли метод проточной цитометрии с использованием зонда дихлорофлуоресцеиндиацетат.

Как видно из представленных однопараметрических гистограмм (рис. 2 А), а также графика с величинами геометрических средних по каналу FL1 (интенсивностей флуоресценции DCF) для диапазона концентраций 1,25—10,00 мМ/л, ДТТ и гомоцистеин снижали внутриклеточную концентрацию АФК по сравнению с контрольными значениями (клетками без воздействия). Для концентраций, меньших 1,25 мМ/л, ДТТ приводил к росту интенсивности флуоресценции зонда, что может свидетельствовать о повышенной генерации АФК в диапазоне концентраций 0,625—0,019 мМ/л.

Гомоцистеин также приводил к росту продукции АФК, однако его действие менее выражено и максимальный эффект достигается в диапазоне 0,625—0,156 мМ/л.

Присутствие в инкубационной среде ДТТ и гомоцистеина при загрузке зонда, по-видимому, обуславливало снижение регистрируемого содержания АФК в клетках. Проведенный анализ динамики концентрации общего гомоцистеина методом tITPCE-MS (transient capillary Isotachopheresis- Mass Spectrometry) в клетках Jurkat показал, что повышение внутриклеточной кон-

центрации гомоцистеина по сравнению с контролем детектировалось на 10-й мин после добавления гомоцистеина в среду в концентрации 2,5 мМ/л. Равновесная внутриклеточная концентрация гомоцистеина регистрировалась спустя 30 мин после начала инкубации. По данным литературы, ДТТ эффективно проникает через цитоплазматическую мембрану, и уже после нескольких минут инкубации обнаруживается его действие внутри клетки [10].

Установившееся равновесное состояние для диапазона концентраций 1,25—10,00 мМ/л и для ДТТ, и для гомоцистеина, характеризовалось сниженным содержанием внутриклеточных АФК, что может свидетельствовать об изменении окислительно-восстановительного состояния клетки. Исключение из инкубационной среды индукторов ДТТ и гомоцистеина приводило к сравнительно быстрому возвращению уровня внутриклеточного АФК к контрольным значениям (рис. 2 Е). Причиной наблюдаемого роста продукции АФК в ходе инкубации с индукторами для диапазона концентраций 0,625—0,156 мМ/л и гомоцистеина, и ДТТ, может быть действие этих соединений на дыхательную цепь переноса электронов митохондрий.

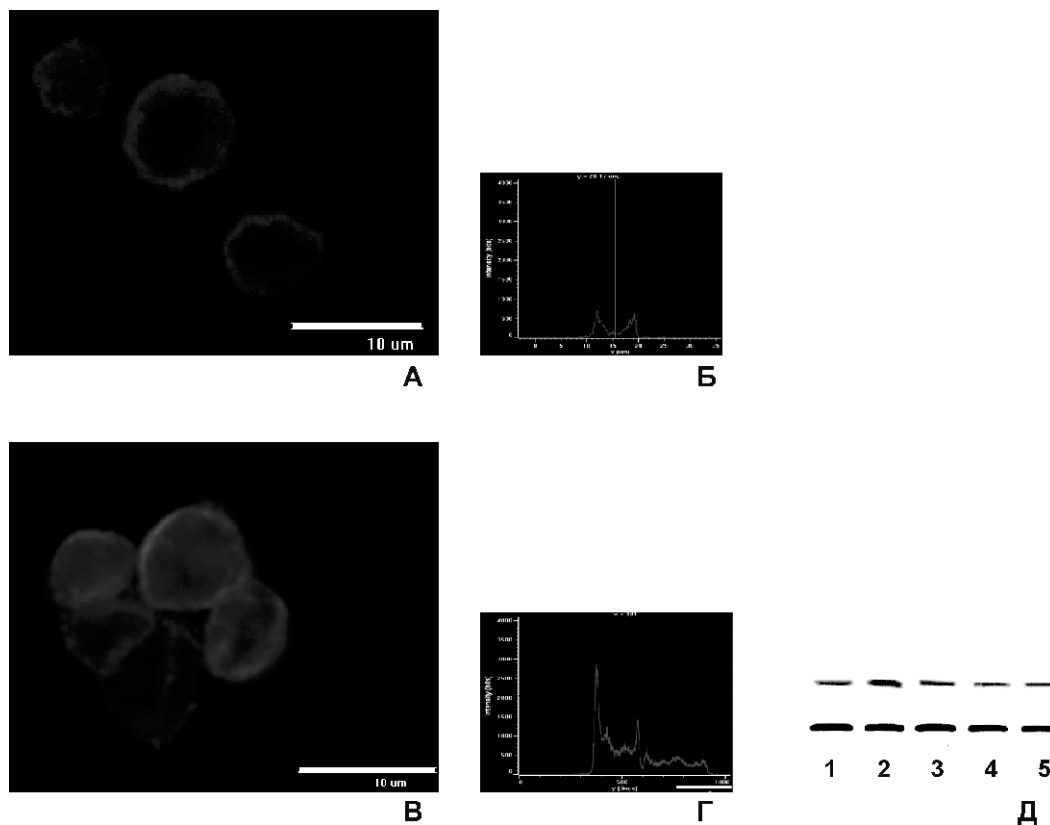


Рис. 1. Экспрессия ЭПР-резидентных белков с сигналом локализации KDEL в клетках Jurkat, инкубированных с ДТТ 18 ч:

А–Г – ЛКСМ микрофотографии и соответствующие гистограммы:

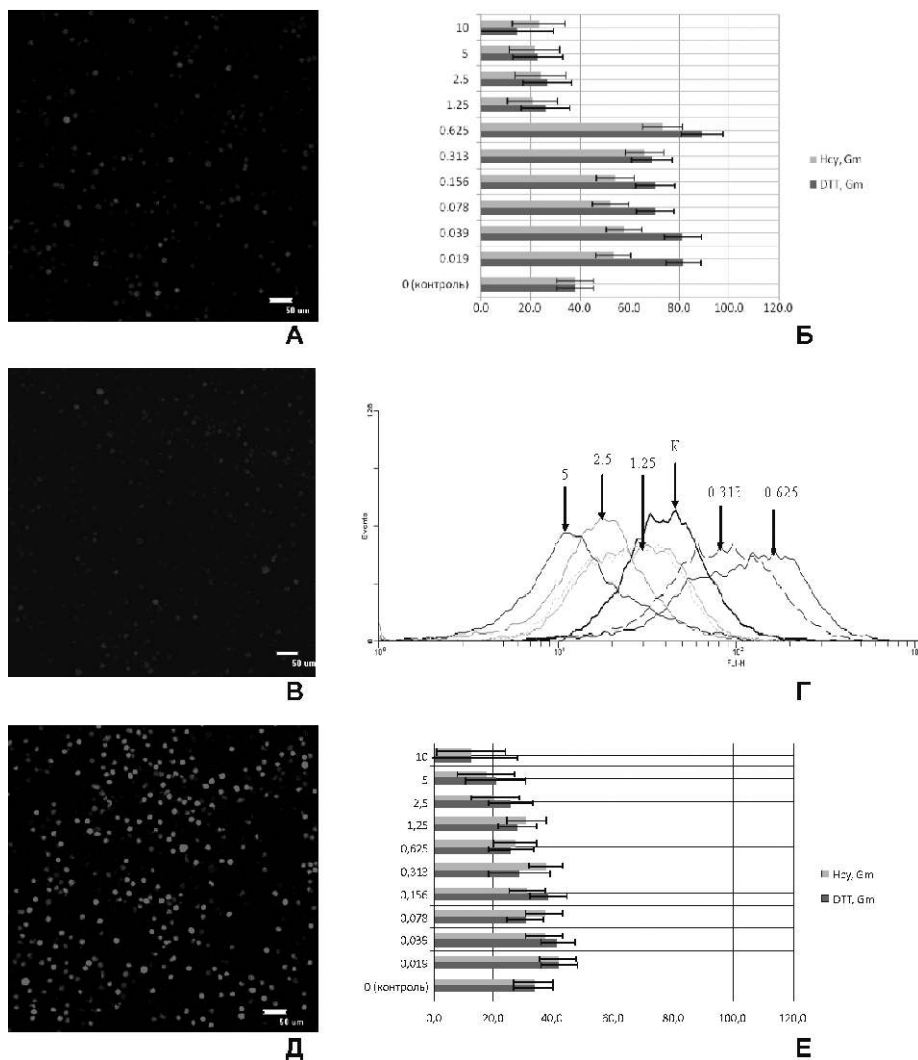
А, Б – контроль, 18 ч без воздействия; В, Г – ДТТ 2,5 мМ/л, 18 ч; Д – вестернблоттинг: 1 – ДТТ 0,31 мМ/л; 2 – ДТТ 2,5 мМ/л; 3 – гомоцистеин 0,31 мМ/л; 4 – гомоцистеин 2,5 мМ/л; 5 – контроль

Показано, что гомоцистеин модулирует продукцию АФК, предполагаемым механизмом этого является возможное образование дисульфидных связей с тиольными группами комплекса I или комплекса III [4].

Цитоплазма клеток, как известно, характеризуется более низким по сравнению с внеклеточной средой окислительно-восстановительным потенциалом — соотношение фракции восстановленного к окисленному глутатиону составляет более 10:1 [5]. Однако люмена эндоплазматического ретикулума более окислена, что создает необходимые условия для образования дисульфидных связей. Инкубация с сое-

динениями-восстановителями, в частности, ДТТ, приводит к росту их внутриклеточной концентрации, что способно нарушать окислительно-восстановительный баланс ЭПР.

В соответствии с полученными данными, индуцированный ДТТ стресс ЭПР в клетках Jurkat в интервале времени до 24 ч не сопровождается развитием окислительного стресса. Состояние редокс-дисбаланса в данном случае характеризуется сниженной концентрацией АФК и представляет собой восстановительный стресс, не ассоциированный с окислительным стрессом.



**Рис. 2.** Анализ генерации АФК в клетках линии Jurkat. Клетки Jurkat инкубировали в среде с ДТТ и гомоцистеином в диапазоне концентраций 0,019–10 мМ/л 24 ч, загружали зондом дихлорфлуоресцеиндиацетат и анализировали с помощью проточной цитометрии для оценки содержания АФК:

А — однопараметрические гистограммы по каналу FL1 для разных концентраций ДТТ (10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; мМ/л, контроль);

Б — график зависимости геометрического среднего пика однопараметрической гистограммы от концентрации индукторов;

В–Г — конфокальные микрофотографии: В — контрольные клетки без воздействия; Г — ДТТ 2,5 мМ/л, 24 ч;

Д — индукция перекисью водорода 1 мМ/л 10 мин (полож. контроль);

Е — клетки Jurkat отмывали от индукторов и доинкубировали 6 ч в ростовой среде без индукторов

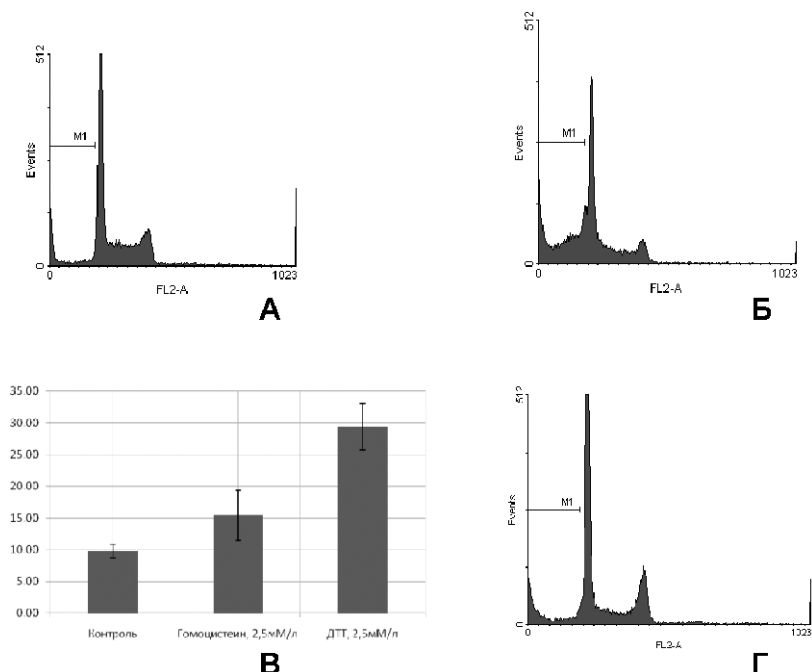


Рис. 3. Анализ индукции апоптоза клеток Jurkat, инкубированных с ДТГ и гомоцистеином 18 ч с последующей отмыжкой и дополнительной инкубацией в течение 6 ч:

А, Б — однопараметрические гистограммы: А — контроль, 24 ч без воздействия; Б — ДТГ 2,5 мМ/л, 24 ч; В — гомоцистеин 2,5 мМ/л, 24 ч

### Апоптоз клеток при действии ДТГ и гомоцистеина

Как видно из приведенных однопараметрических гистограмм (интервал sub-G1, рис. 3А,Б) и графика, отражающего долю апоптотических клеток, действие индуктора ДТГ приводит к росту апоптоза (29,35%). Гомоцистеин оказывает заметно меньшее действие на клетки, процент апоптотических клеток составляет 15,40%.

Таким образом, действие ДТГ в клетках Jurkat приводит к индукции стресса ЭПР и принятию решения об индукции апоптоза частью клеточной популяции. Действие гомоцистеина сопряжено с небольшим ростом процента апоптотических клеток, однако, для концентрации 2,5 мМ/л нами не показана индукция ЭПР-стресс-ассоциированных белков, что может, по-видимому, свидетельствовать об ином механизме действия гомоцистеина, возможно, опосредуемом митохондриями. Падение выживаемости клеток в условиях восстановительного стресса при действии ДТГ может быть обусловлено, по-видимому, изменениями тиол-дисульфидного статуса протеома клетки. Важной стороной этого вопроса может быть модуляция процессов окислительного фолдинга.

Кроме непосредственного действия на белки в люмене эндоплазматического ретикулума, ДТГ снижает уровень АФК в клетке. Ряд недавних исследований указывает на наличие альтернативных механизмов

формирования дисульфидных связей в клетках млекопитающих [9]. Предполагаемыми участниками этих процессов наряду с ферментами, в частности, семейства QSOX [1], могут быть низкомолекулярные окислители. В частности, показана возможность окисления пероксиредоксинов (peroxiredoxin-4, Prx4) ЭПР перекисью водорода и непосредственное участие перекиси водорода в процессах образования дисульфидных связей *in vitro* с минимальным окислительным повреждением белков [7, 12]. В клетках Jurkat продукция АФК при стрессе ЭПР не повышена, что может быть ассоциировано со сравнительно не высоким уровнем синтеза белка «на экспорт». Однако не исключено, что для других типов клеток наблюдавшаяся повышенная продукция АФК при стрессе ЭПР может представлять собой в определенной степени адаптивный процесс, направленный на поддержание окислительно-восстановительного баланса ЭПР и окислительного фолдинга. В связи с этим интересна функциональная взаимосвязь и физическая ассоциация эндоплазматической и митохондриальной ретикулярных сетей [3]. Следует отметить ряд исследований, указывающих на участие митохондрий в процессах формирования дисульфидных связей. В частности, показана роль продуцируемых митохондриями АФК в регуляции дисульфидных связей белков протеома в клетках млекопитающих [15].

Таким образом, ДТГ в клетках Т-лимфобластной лейкемии человека Jurkat вызывает окислительно-восстановительный дисбаланс, сопровождающийся стрессом эндоплазматического ретикула, снижением концентрации внутриклеточных активных форм кислорода и индукцией апоптоза в части клеточной популяции. Гомоцистеин не является для данного типа клеток эффективным индуктором стресса ЭПР в исследованном диапазоне концентраций, его действие сводится к менее выраженным по сравнению с ДТГ изменениям внутриклеточного пула АФК.

### Список литературы

1. *Chakravarthi S., Jessop C.E., Willer M., Stirling C.J., Bulleid N.J.* Intracellular catalysis of disulfide bond formation by the human sulfhydryl oxidase, QSOX1 // *Biochem. J.* — 2007. — 404. — P. 403–411.
2. *Ellgaard L., Molinari M., Helenius A.* Setting the standards: Quality control in the secretory pathway // *Science.* — 1999. — 286. — P. 1882–1888.
3. *Johnson J.D., Bround M.J., White S.A., Luciani D.S.* Nanospaces between endoplasmic reticulum and mitochondria as control centres of pancreatic  $\beta$ -cell metabolism and survival // *Protoplasma.* — 2012. — 249 (Suppl. 1). — S49–S58.
4. *Gomez J., Sanchez-Roman I., Gomez A., Sanchez C., Suarez H., Lopez-Torres M., Barja G.* Methionine and homocysteine modulate the rate of ROS generation of isolated mitochondria in vitro // *J. Bioenerg. Biomembr.* — 2011. — 43. — P. 377–386.
5. *Griffith O.W.* Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis // *Free Radic. Biol. Med.* — 1999. — 27. — P. 922–935.
6. *Hartl F.U., Hayer-Hartl M.* Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2009. — 16. — P. 574–581.
7. *Kakihana T., Nagata K., Sitia R.* Peroxides and Peroxidases in the Endoplasmic Reticulum: Integrating Redox Homeostasis and Oxidative Folding // *Antioxidants & redox signaling.* — 2012. — Vol. 16, 8. — P. 763–771.
8. *Malhotra J.D., Kaufman R.J.* Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: A Vicious Cycle or a Double-Edged Sword? // *Antioxidants & redox signaling.* — 2007. — Vol. 9, №12. — P. 2277–2293.
9. *Margittai E., Banhegyi G.* Oxidative folding in the endoplasmic reticulum: Towards a multiple oxidant hypothesis? // *FEBS Letters.* — 2010. — 584. — P. 2995–2998.
10. *Merksamer P.I., Trusina A., Papa F.R.* Real-Time Redox Measurements during Endoplasmic Reticulum Stress Reveal Interlinked Protein Folding Functions // *Cell.* — 2008. — 135, 26. — P. 933–947.
11. *Outinen P.A., Sood S.K., Pfeifer S.I.* et al. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells // *Blood.* — 1999. — 94. — P. 959–967.
12. *Ruddock L.W.* Low-Molecular-Weight Oxidants Involved in Disulfide Bond Formation // *Antioxidants & redox signaling.* — 2012. — Vol. 16, 10. — P. 1129–1138.
13. *Tu B.P., Weissman J.S.* The FAD- and O(2)-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum // *Mol. Cell.* — 2002. — 10. — P. 983–994.
14. *Tu B.P., Weissman J.S.* Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences // *J. Cell. Biol.* — 2004. — 164. — P. 341–346.
15. *Yang Y., Song Y., Loscalzo J.* Regulation of the protein disulfide proteome by mitochondria in mammalian cells // *PNAS.* — 2007. — Vol. 104, №26. — P. 10813–10817.
16. *Zhang C.* et al. Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response // *J. Biol. Chem.* — 2001. — 276. — P. 35867–35874.

Поступила 18.05.12

### Сведения об авторах:

*Игнашкова Татьяна Игоревна*, аспирант лаб. молекулярных механизмов тромбогенеза и тромболизиса ФГБУ «НИИОПП» РАМН

*Мещерский Михаил Евгеньевич*, научн. сотр. лаб. молекулярных механизмов тромбогенеза и тромболизиса

*Акопов Александр Сергеевич*, аспирант лаб. молекулярных механизмов тромбогенеза и тромболизиса ФГБУ НИИОПП РАМН

*Московцев Алексей Александрович*, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. молекулярных механизмов тромбогенеза и тромболизиса ФГБУ НИИОПП РАМН

*Соколовская Алиса Анатольевна*, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. функциональной геномики и липидомики ФГБУ НИИОПП РАМН

*Кубатиев Аслан Амирханович*, д-р мед. наук, проф., акад. РАМН, зав. лаб. молекулярных механизмов тромбогенеза и тромболизиса, директор ФГБУ НИИОПП РАМН

М.А. Лебедева<sup>1</sup>, В.Ю. Богачев<sup>2</sup>, К.С. Терновой<sup>2</sup>, Н.Е. Никушкина<sup>3</sup>, М.Ю. Карганов<sup>1</sup>

## **Сердечная патология и вегетативные нарушения у пациентов с позвоночно-спинномозговой травмой**

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

<sup>2</sup> Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова», 119992, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

<sup>3</sup> Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

*Функции сердечно-сосудистой системы были исследованы у 103 пациентов с позвоночно-спинномозговой травмой. Оценивали функцию проводимости миокарда и регуляцию ритма сердца методом спиреоартериокардиографии. Спектральный и временной анализы вариабельности сердечного ритма были использованы для сравнения показателей вариабельности у пациентов с травмой позвоночника и здоровых испытуемых. Дисфункции, обнаруженные в работе автономной нервной системы у больных с травмами позвоночника, могут быть причиной тяжелых сердечно-сосудистых осложнений и патологии миокарда.*

**Ключевые слова:** автономная дисфункция, вариабельность сердечного ритма, сердечно-сосудистые осложнения, травма позвоночника

М.А. Lebedeva<sup>1</sup>, V.Yu. Bogachov<sup>2</sup>, K.S. Ternovoy<sup>2</sup>, N.E. Nikushkina<sup>3</sup>, M.Yu. Karganov<sup>1</sup>

## **Cardiac pathology and autonomic dysfunction in patients with vertebral and spinal cord injury**

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

<sup>2</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8-2, Trubetskaya street, Moscow, 119992, Russia

<sup>3</sup> N.I. Pirogov Russian National Research University, 1, Ostrovityanova str., Moscow, 117997, Russia

*The disturbances of cardiovascular function were examined in 103 patients with vertebral and spinal cord injury. To evaluate myocardial conduction time and regulation of heart rate we used the method of spiroarteriocardiorhythmography. Comparative power spectral and time domain analyses of heart rate variability were carried out in patient and healthy individuals. The autonomic nervous system dysfunction revealed in patients result in severe cardiovascular complications and is associated with high risk of heart diseases.*

**Key words:** autonomic dysfunction, heart rate variability, cardiovascular disturbances, a backbone trauma

Сердечно-сосудистые осложнения являются распространенными последствиями позвоночно-спинномозговой травмы [10]. Кроме того, переломы позвоночника с повреждением сегментарных спинномозговых структур или нисходящих путей из высших вегетативных центров сопровождаются грубыми нарушениями автономных функций организма [8]. Нарушения вегетативной регуляции могут влиять на функцию проводящей системы сердца и на модуляцию активности синусового узла [1, 2]. Дизрегуляция в работе сердечно-сосудистой системы, а также проявления автономной дизрефлексии часто приводят к гибели пациентов с позвоночно-спинномозговой травмой [14]. Негативные

патологические реакции в системе кровообращения могут возникать у них при проведении реабилитационных мероприятий. Поэтому необходимо проводить диагностику адекватности механизмов регуляции сердечного ритма и оценивать резервы сердечно-сосудистой системы таких пациентов.

*Цель исследования* — выявление функциональной кардиальной патологии и вегетативных дисфункций у больных с переломами позвоночника различной степени тяжести.

### **Методика**

Исследование состояния сердечно-сосудистой системы проведено на приборе спиреоартериокардиографии, производитель — ООО «ИНТОКС», г. Санкт-Петербург [6]. В обследовании приняли участие 103 пациента обоего пола (средний возраст

**Для корреспонденции:** Лебедева Марина Андреевна, канд. биол. наук, вед. научн. сотр. лаб. полисистемных исследований ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: ma\_lebedeva@mail.ru.

39,0±2,8 года) с травмами шейного и/или грудного отделов позвоночника. У всех пациентов проводили одно-временную регистрацию электрокардиограммы в I-м стандартном отведении, периферического артериального давления (пАД) в пальцевой артерии по методу Пеназа и показателей дыхания. При обработке 2-минутных записей анализировали сердечный ритм, длительность R-R интервалов, проводимость миокарда, морфологию и динамику зубцов, интервалов и сегментов ЭКГ. Оценивали некоторые показатели гемодинамики: частоту сердечных сокращений — (ЧСС), показатели неинвазивного систолического и диастолического пАД.

Для анализа вариабельности сердечного ритма (ВСР) как интегрального показателя состояния сердечно-сосудистой системы использовали временной и спектральный анализ ВСР. Оценивали следующие временные показатели ВСР, рассчитываемые по массиву кардиоинтервалов: SDNN (мс) — стандартное отклонение величин нормальных RR интервалов за весь рассматриваемый период; PNN50 (%) — процент пар последовательных интервалов, различающихся более чем на 50 мс, от общего количества последовательных пар нормальных RR интервалов; RMSSD (мс) — квадратный корень из суммы квадратов разностей величин последовательных пар нормальных RR интервалов. Кроме того, с помощью геометрических методов вычисляли индекс напряжения регуляторных систем (ИН), отражающий степень преобладания активности центральных механизмов регуляции над автономными. Из спектральных показателей вариабельности сердечного ритма оценивали: Tr — общая мощность спектра; HF — мощность спектра высокочастотного диапазона ВСР; LF — мощность спектра низкочастотного диапазона вариабельности; и VLF — мощность спектра в диапазоне очень низких частот [12].

Для клинической оценки состояния парасимпатического эфферентного пути использовали функциональную пробу с глубоким медленным дыханием

(6 циклов в 1 мин), и определяли изменения ЧСС и длительности R-R интервалов. Вычисляли коэффициент дыхательной аритмии (K<sub>дых</sub>): отношение наибольшего кардиоинтервала во время выдоха к наиболее короткому во время вдоха. При проведении данного кардиоваскулярного теста в контрольную группу вошли здоровые испытуемые обоего пола (n=51, средний возраст 31,8±1,0 год).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistika 6.0. В зависимости от типа распределения достоверность различий между группами определяли с использованием критериев Манна—Уитни, Стьюдента, дисперсионного анализа ANOVA. Различия считали статистически значимыми при уровне  $p < 0,05$ . Некоторые параметры, кроме абсолютных значений оценивали непараметрическим центильным методом.

### Результаты и обсуждение

У пациентов с различными травмами шейного и грудного отделов позвоночника наблюдали выраженные отклонения в работе сердечно-сосудистой системы. Их клиническая картина и выраженность зависели от локализации и степени повреждения спинного мозга и костных структур. У 46 пациентов (44,7%) было выявлено нарушение сердечного ритма по типу брадикардии, которое было наиболее выражено при осложненном переломе шейного отдела позвоночника (табл. 1). В четырех наблюдениях были диагностированы суправентрикулярная (n=2) и желудочковая экстрасистолии (n=2).

Нарушение функции проводимости миокарда по типу внутрипредсердной блокады было обнаружено у 19,4% пациентов, атриовентрикулярные блокады наблюдали в 24,3% случаев. Внутрижелудочковые блокады были выявлены только в группе с осложненными травмами позвоночника и составили 2,8% (n=2). Сочетание различных видов блокад также было выявлено только в этой группе пациентов (n=3).

Таблица 1

Центильное распределение (%) показателей ЧСС и интервалометрии ЭКГ у группы пациентов с осложненной травмой позвоночника

Показатель	Осложнённая травма позвоночника									
	Шейный отдел					Грудной отдел				
	<5	5–25	25–75	75–95	>95	<5	5–25	25–75	75–95	>95
ЧСС, 1/мин	31,5	27,0	28,0	4,5	9,0	17,1	20,9	41,1	15,2	5,7
P, с	9,0	9,0	28,0	36,0	18,0	1,9	7,6	37,3	30,4	22,8
PQ, с	4,5	0	41,5	31,5	22,5	0	0	41,1	30,4	28,5
QR, с	36,0	22,5	32,5	9,0	0	13,3	32,3	37,3	15,2	1,9
QRS, с	18,0	4,5	64,0	9,0	4,5	7,6	17,1	52,5	20,9	1,9
QT, с	4,5	13,5	23,5	18,0	40,5	1,9	5,7	43,0	22,8	26,6
ST, у.е.	0	4,5	14,5	40,5	40,5	3,8	15,2	29,7	24,7	26,6

Увеличение длительности интервала QT, отражающего уровень кровоснабжения миокарда, чаще отмечается у пациентов с осложнённой травмой позвоночника. Важность своевременной диагностики данного нарушения проводимости связана с риском развития желудочковых аритмий [7]. Причинами удлинения интервала QT являются снижение симпатических влияний на сердечную деятельность и дисбаланс вегетативной регуляции [4]. Опосредованным механизмом, по мнению этих авторов, может служить нарушение электролитного баланса, которое также возникает вследствие нарушения вегетативной регуляции. Также у пациентов с травмой позвоночника были обнаружены подъем или депрессия сегмента ST. При осложнённой травме шейного отдела позвоночника отмечалось более выраженное нарушение реполяризации желудочков. По данным клинических наблюдений элевация сегмента ST чаще наблюдается у пациентов с высоким уровнем травмы, и происходит из-за ослабления симпатической активности, повышения вагусного тонуса или ишемии миокарда [13]. В ряде случаев изменения на ЭКГ носили сочетанный характер. Из представленных данных, очевидно, что чем тяжелее травма позвоночника, тем чаще выявляются серьезные нарушения проводимости миокарда.

При анализе ВСП (табл. 2) обнаружено, что у пациентов с травмами позвоночника снижена суммарная мощность спектра variability сердечного ритма TP, эта особенность была более выражена при локализации травмы в шейном отделе. При этом

уменьшался вклад как низкочастотной, так и очень низкочастотной составляющей спектра variability, а уровень высокочастотной компоненты спектра мощности более чем у половины пациентов имел нормальные значения (51,8% при травме шейного, 57,4% при травме грудного отдела позвоночника). Уменьшение симпатических влияний в группе с шейной локализацией травмы связывают с утратой нисходящих супраспинальных влияний, а в группе с грудной локализацией травмы — с повреждением сегментарных симпатических центров. Снижение мощности спектра ВСП в очень низкочастотном диапазоне свидетельствовало об ослаблении влияний на сердечный ритм надсегментарных вегетативных центров, гуморально-метаболических факторов, ренин-ангиотензиновой системы, эндотелиальных факторов [8, 11]. При этом показатель симпато-вагального баланса (отношение LF/HF), по нашим данным, поддерживался на оптимальном уровне [3]. Это согласуется с данными литературы. Однако симпато-парасимпатический баланс, вычисленный, как отношение LF/HF, не всегда адекватно отражает функциональную достаточность регуляторных механизмов ВНС. У пациентов с травмами позвоночника и нарушением целостности спинномозговых структур для выявления и предупреждения угрожающих состояний со стороны сердечно-сосудистой системы требуется проводить анализ ВСП различными методами. Поэтому в данной работе кроме спектрального анализа, мы использовали также временной и геометрический методы обработки массива кардиоинтервалов.

Таблица 2

Центильное распределение (%) спектральных показателей variability сердечного ритма у обследованной группы пациентов

Показатель	Травма позвоночника									
	Шейный отдел					Грудной отдел				
	<5	5–25	25–75	75–95	>95	<5	5–25	25–75	75–95	>95
TP, мс	20,1	37,8	25,4	11,9	4,8	19,3	29,8	32,2	14,1	4,6
VLF, мс	17,2	29,3	47	2,4	4,1	29,7	16,7	35,3	15,1	3,2
LF, мс	31,6	7,6	47,1	13,7	0	22,4	17,3	29,8	27,3	3,2
HF, мс	21,8	14,3	51,8	8,7	3,4	23	10,1	57,4	4,1	5,4

Таблица 3

Значения временных показателей variability сердечного ритма при различной локализации травмы позвоночника

Параметры	I группа. Шейный отдел, n=38	II группа. Грудной отдел, n=65	Контроль. Здоровые, n=30
SDNN, мс	33,47±3,44 p<0,01	40,01±3,51 p<0,01	68±6,1
RMSSD, мс	35,62±5,52 p<0,01	58,37±11,44	66±7,6
pNN50, %	8,81±0,92 p<0,01	13,13±4,61 p<0,05	28±3,9



Количество пациентов (%) с различным типом вегетативного тонуса и опасным превышением значений ИН

Вид травмы	Отклонение индекса			
	Пониженный (ваготоники)	Нормальный (эйтионики)	Повышенный (симпатотоники)	Критический высокий
Травма шейного отдела позвоночника	21%	12,9%	42,1%	24%
Травма грудного отдела позвоночника	23%	13,8%	36,9%	26,3%
Суммарно по всей выборке	22,3%	13,6%	38,8%	25,3%

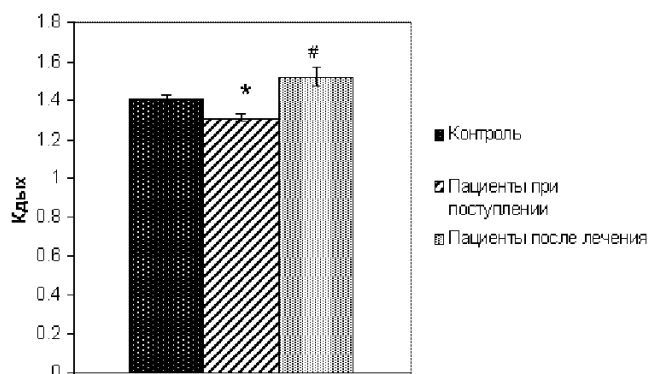
Показатель временного анализа SDNN, характеризующий вариабельность ритма сердца, в целом (табл. 3), будучи математическим эквивалентом общей мощности спектра, также был снижен у пациентов с переломами шейного и грудного отделов по сравнению с группой здоровых обследованных [9]. Ряд авторов связывает низкую ВСР с последующей возможностью возникновения сердечных аритмий [5]. В литературе имеются экспериментальные и клинические подтверждения тому, что при уменьшении значений Тр и SDNN, отражающих общий тонус вегетативной нервной системы (ВНС), возрастает риск смерти от сердечно-сосудистой патологии [11, 15].

Активность парасимпатического звена вегетативной регуляции оценивалась по показателям RMSSD и PNN50 (%). Значения параметра RMSSD в группе пациентов с переломами в грудном отделе не выходили за пределы контрольных значений и свидетельствовали об адекватной активности парасимпатического звена регуляции. Эти параметры были достоверно ниже в группе больных с шейной локализацией травмы, по сравнению с контролем и группой с грудной локализацией травмы, что указывает на уменьшение преобладания парасимпатического отдела ВНС над симпатическим у этих пациентов.

Кроме того, определяли реактивность парасимпатического отдела ВНС по коэффициенту  $K_{\text{дых}}$  в пробе с глубоким медленным дыханием. Считается, что этот параметр является менее зависимым от симпатической компоненты. При обработке всего массива данных мы не выявили различий в значении  $K_{\text{дых}}$  для контрольной группы ( $1,41 \pm 0,02$ ) и между группами с локализацией травмы в шейном ( $1,42 \pm 0,03$ ) и грудном ( $1,49 \pm 0,04$ ) отделах позвоночника. Однако при анализе данных, полученных при динамических обследованиях, был обнаружен достоверно сниженный уровень  $K_{\text{дых}}$  ( $1,31 \pm 0,02$ ,  $p < 0,05$  по сравнению с контролем) у 23 пациентов (15 — осложненный грудной перелом, 2 — неосложненный; 5 — осложненный шейный перелом, 1 — неосложненный) при их поступлении в стационар (рисунок). Такой срыв вегетативного контроля сердечной деятельности ведет к нарушению симпатико-парасимпатического баланса и формированию патологических вегетативных реакций. Недостаточная компенсаторная парасимпатическая активация может быть предпосылкой для проявления нежелательных симпатических эффектов: приступов внезап-

ной тахикардии, тахипноэ и повышения АД. Положительная динамика показателя  $K_{\text{дых}}$  наблюдалась у пациентов этой группы после проведенного лечения ( $1,52 \pm 0,05$ ,  $p < 0,01$ ; repeated measures of ANOVA).

Индекс напряжения, отражающий уровень централизации управления сердечным ритмом высшими вегетативными центрами, имел наибольшие отклонения от нормальных значений у пациентов при травмах позвоночника. В табл. 4 представлено распределение пациентов с учетом их вегетативного тонуса. ИН характеризует мобилизацию функциональных резервов организма при воздействиях, связанных с повышением активности симпатического отдела ВНС. Независимо от локализации повреждения позвоночных и спинномозговых структур ИН имел функционально адекватные показатели лишь в 13% случаев, чуть более 20% наблюдений демонстрировали снижение этого показателя, около 40% — повышение. Четверть всех пациентов имела критически высокий уровень напряжения систем регуляции. Столь высокие значения ИН выявляют преобладание влияния симпатического отдела ВНС на ритм сердца, что может привести к формированию неадекватных реакций со стороны системы кровообращения, нарушениям электрической стабильности миокарда. В целом, такое распределение ИН свидетельствует о значительном напряжении регуляторных механизмов и нарушении вегетативного контроля сердечной деятель-



Значение коэффициента дыхательной аритмии ( $K_{\text{дых}}$ ) у пациентов до и после лечения, а также в группе здоровых испытуемых:

\* —  $p < 0,05$  — достоверные отличия от контроля; # —  $p < 0,05$  — достоверные различия между группами

ности. Ослабление автономного контура регуляции может быть плохим прогностическим фактором для пациентов с позвоночно-спинномозговой травмой.

В проведенном исследовании у пациентов с переломами шейного и грудного отделов позвоночника были выявлены нарушения ритма по типу брадикардии и нарушения проводимости миокарда, которые проявлялись внутрипредсердной и атриовентрикулярной блокадами, удлинением интервала QT и элевацией сегмента ST. Их выраженность зависела от степени тяжести травмы. Анализ ВСР, проведенный с использованием нескольких методов, позволил оценить характер сдвигов в нейровегетативной регуляции сердечного ритма. Была выявлена недостаточность вагусной регуляции кардиоритма, при этом у части пациентов наблюдалось ослабление симпатических влияний на сердце. Обнаружено снижение показателей общей мощности спектра variability ритма сердца  $T_p$  и SDNN и значительное превышение значений индекса напряжения ИН, что может свидетельствовать об истощении регуляторных механизмов у пациентов с позвоночно-спинномозговой травмой.

Таким образом, данное исследование подтверждает необходимость оценки функционального состояния сердечно-сосудистой системы у пациентов с позвоночно-спинномозговой травмой. При этом важно применять комплексный подход, использовать различные методы ритмографического анализа для раннего выявления потенциально опасных посттравматических осложнений, их своевременной коррекции и улучшения прогноза проводимого лечения. Это поможет врачам-травматологам адресно и адекватно подобрать для пациентов оперативное пособие и реабилитационные мероприятия, которые активируют компенсаторные механизмы и помогут повысить функциональные резервы основных жизнеобеспечивающих систем организма.

### Список литературы

1. *Баевский Р.М., Иванов Г.Г.* Variability сердечного ритма: теоретические аспекты и возможности клинического применения. — М.: Медицина, 2000. — 295 с.
2. *Жданов А.М., Пономаренко В.Б., Первова Е.В.* Variability сердечного ритма у больных синдромом

слабости синусового узла // Вестник аритмологии. — 2006. — №43. — С. 28—33.

3. *Кавалерский Г.М., Терновой К.С., Богачёв В.Ю.* и др. Особенности функционального состояния сердечно-сосудистой и дыхательной систем при вертебро-висцеральном синдроме // Вестник восстановительной медицины. — 2011. — №5. — С. 28—33.

4. *Нагорная Н.В., Конопко Н.Н., Четверик Н.А.* Синдром удлинённого интервала QT как причина синкопальных и жизнеугрожающих состояний // Здоровье ребёнка. — Донецк. — 2007. — №2(5). — С. 8—22.

5. *Рябыкина Т.В., Соболев А.В.* Variability ритма сердца. — М.: «Стар Ко», 1998. — 265 с.

6. *Пуговаров В.В.* Спираартериокардитомограф. — Санкт-Петербург: Медицинская техника. — 2006. — Ч. 1. — 623 с.

7. *Шулов А.М., Мельник М.В., Санодзе И.Д.* Диагностика, профилактика и лечение синдрома удлинения QT интервала: Методические рекомендации. — М., 2001. — 28 с.

8. *Claydon V.E., Krassioukov A.V.* Clinical correlates of frequency analyses of cardiovascular control after spinal cord injury // Am J. Physiol. — 2008. — Feb. — 294(2). — P. 668—678.

9. *Dantas E.M., Goncalves C.P., Silva A.B.* et al. Reproducibility of heart rate variability parameters measured in healthy subjects at rest and after a postural change maneuver // J. Med. Biol. Res. — 2010. — Vol. 43. — P. 982—988.

10. *Grigorean V.T., Sandu A.M., Popescu M.* et al. Cardiac dysfunctions following spinal cord injury // J. Med. Life. — 2009. — April 15;2(2). — P. 133—145.

11. *Inskip J.A., Ramer L.M., Ramer M.S.* et al. Spectral analyses of cardiovascular control in rodents with spinal cord injury // J. Neurotrauma. — 2012. — Vol. 29(8). — P. 1638—1649.

12. Heart rate variability. Standart of measurement, physiological, and clinical use. Task Force of European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology // Europ. Heart J. — 1996. — Vol. 17. — P. 354—381.

13. *Marcus R.R., Kalisetti D., Raxwal V.* et al. Early repolarization in patient with spinal cord injury, prevalence and clinical significance // J. Spinal Cord. Med. — 2002. — Spring, 25(1). — discussion — 39. — P. 33—38.

14. *Myers J., Lee M., Kiratli J.* Cardiovascular disease in spinal cord injury: an overview of prevalence, risk, evaluation, and management // Am J. Phys. Med. Rehabil. — 2007. — Feb. — Vol. 86(2). — P. 142—152.

15. *Pumprla J., Howorka K., Groves D.* et al. Functional assessment of heart rate variability: physiological basis and practical applications // J. Cardiol. — 2002. — Vol. 84. — P. 1—14.

Поступила 15.05.12

### Сведения об авторах:

*Богачёв Владимир Юрьевич*, аспирант каф. травматологии, ортопедии и хирургии катастроф ПМГМУ им. И.М. Сеченова

*Терновой Константин Сергеевич*, канд. мед. наук, доц. каф. травматологии, ортопедии и хирургии катастроф ПМГМУ им. И.М. Сеченова

*Никушкина Нина Евгеньевна*, студент VI курса Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова

*Карганов Михаил Юрьевич*, проф., д-р биол. наук, зав. лаб. полисистемных исследований ФГБУ «НИОПП» РАМН

И.А. Собенин<sup>2</sup>, В.П. Карагодин<sup>1</sup>, А.А. Мельниченко<sup>1</sup>, А.Н. Орехов<sup>1,2</sup>

## Холестерин циркулирующих иммунных комплексов как индикатор атеросклероза

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт атеросклероза Российской Академии естественных наук, 143025, Москва, Инновационный Центр Сколково, ул. Новая, д.100

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Изучена диагностическая и прогностическая значимость иммунного холестерина у 98 мужчин в возрасте 40–74 лет с ранним бессимптомным атеросклерозом сонных артерий. Прогрессирование атеросклероза оценивали по изменению толщины интимо-медиаляльного слоя (ИМС) сонных артерий с помощью ультрасонографии высокого разрешения в В-режиме. У пациентов с повышенным уровнем иммунного холестерина толщина ИМС сонных артерий была достоверно увеличена. Из всех изученных липидных параметров только иммунный холестерин и холестерин липопротеидов низкой плотности (ЛНП) были достоверно сопряжены со степенью выраженности атеросклероза. Исходная толщина ИМС составляла  $0,939 \pm 0,015$  мм. Динамика изменений толщины ИМС характеризовалась медленным увеличением со скоростью  $0,029 \pm 0,011$  мм за 2 года наблюдения ( $p=0,028$ ). Достоверное увеличение толщины ИМС было отмечено у 53,1% больных, и у 21,4% наблюдалась спонтанная регрессия поражений. Повышенный уровень иммунного холестерина, наряду с повышенным уровнем общего холестерина и холестерина ЛНП, имел прогностическую значимость в отношении прогрессирования каротидного атеросклероза. Нормальный уровень иммунного холестерина (ниже 16 мкг/мл) был единственным липидным параметром, предвещающим отсутствие прогрессирования каротидного атеросклероза в течение 2 лет с прогностической значимостью 78,3%. Результаты данного исследования показывают, что содержание иммунного холестерина в крови не только является маркером раннего атеросклероза, но также имеет высокую прогностическую ценность.

**Ключевые слова:** атеросклероз; липопротеиды низкой плотности; циркулирующие иммунные комплексы; ультразвуковая диагностика; толщина интимо-медиаляльного слоя

I.A. Sobenin<sup>2</sup>, V.P. Karagodin<sup>1</sup>, A.A. Melnichenko<sup>1</sup>, A.N. Orekhov<sup>1,2</sup>

## Cholesterol of circulating immune complexes as an atherosclerosis indicator

<sup>1</sup> Institute for Atherosclerosis Research, Russian Academy of Natural Sciences, Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Center, 143025, 100 Novaya Str., Moscow, Russia

<sup>2</sup> Institute for General Pathology and Pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

In the present 2-years prospective study, the diagnostic and prognostic significance of immune cholesterol was assessed in 98 asymptomatic men aged 40–74 with early atherosclerosis. The rate of carotid atherosclerosis progression was estimated by high-resolution B-mode ultrasonography as the increase in carotid intima-media thickness (IMT) of common carotid arteries. The patients with elevated baseline levels of immune cholesterol were characterized by significantly higher levels of total and LDL (low density lipoproteins) cholesterol as well as significantly increased mean IMT of common carotid arteries. Among all baseline lipid parameters, only immune cholesterol and LDL cholesterol were contingent with the extent of early carotid atherosclerosis ( $p=0.042$  and  $p=0.049$ , respectively) and had the highest levels of relative risk and odds ratio. Carotid atherosclerosis progression was characterized by slow IMT increase at a rate of  $0.029 \pm 0.011$  mm per two years over the mean baseline IMT of  $0.939 \pm 0.015$  mm ( $p=0.028$ ). A significant IMT increase was registered in 53.1% ( $n=52$ ) patients, IMT significant reduction was observed in 21.4% ( $n=21$ ) patients. The increased level of immune cholesterol along with total serum cholesterol and LDL cholesterol had rather high prognostic significance with the respect of atherosclerosis progression. The normal level of immune cholesterol (below than 16.0 mg/ml) was the only lipid parameter that predicted the absence of carotid atherosclerosis progression for two following years at prognostic value of 78.3%. The results of the study allow assuming that immune cholesterol level may be employed not only as a marker of early atherosclerosis, but also has a sufficient prognostic value for clinical implications.

**Key words:** atherosclerosis, low density lipoproteins, circulating immune complexes, ultrasonography, intima-media thickness

Для корреспонденции: Карагодин Василий Петрович, канд. биол. наук, доцент «НИИ атеросклероза» РАЕН.  
E-mail: vpk@mail.ru

## Методика

Атеросклероз в настоящее время является наиболее распространенным и социально значимым заболеванием в индустриальных странах, и его клинические проявления занимают до 65% в структуре общей смертности.

В развитие атеросклероза вносят вклад не только различные нарушения липидного обмена, регуляции свертывающей системы крови, метаболизма сосудистой стенки, регуляции артериального давления, но и иммунологические факторы, такие, как аутоантитела против модифицированных липопротеидов низкой плотности (ЛНП) и ЛНП-содержащие циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК).

На уровне артериальной стенки типичной чертой раннего атеросклеротического поражения является внутриклеточное отложение липидов [6]. Было установлено, что модифицированные ЛНП и особенно ЛНП-содержащие иммунные комплексы способны вызывать существенное накопление холестерина в клетках интимы аорты человека [7, 14, 15]. Накопление липидов в клетках приводит к прогрессированию процессов атерогенеза, включающих избыточный синтез компонентов соединительнотканного матрикса, повышение пролиферативной активности и, возможно, развитие локальных воспалительных реакций [8]. Повышенное количество ЛНП-содержащих ЦИК в крови, определяемое по уровню иммунного холестерина (Х-ЦИК), характерно для атеросклероза коронарных и периферических артерий [10]. Уровень Х-ЦИК коррелирует со степенью выраженности и распространенностью атеросклеротических поражений и обладает высокой диагностической значимостью. Прогностическая значимость данного параметра ранее не изучалась. Можно предположить, что ЛНП-содержащие ЦИК имеют важное значение в прогрессировании атеросклероза, поскольку могут вызывать накопление холестерина в клетках сосудистой стенки.

В данном исследовании была изучена связь между уровнем Х-ЦИК и прогрессированием атеросклероза.

В исследовании приняли участие 98 мужчин в возрасте 40—74 лет с ранним бессимптомным атеросклерозом сонных артерий. Ультразвуковое обследование проводилось трижды перед включением в исследование, 1 раз в 3 мес. в течение первого года наблюдения, 1 раз в 6 мес. в течение второго года наблюдения, и трижды по окончании исследования. Протокол ультразвукового обследования включал сканирование обеих сонных артерий в В-режиме в трех проекциях до области каротидного синуса с помощью линейного датчика 7,5 МГц [12]. Толщину интимо-медиального слоя (ИМС) измеряли по видеозаписи с помощью компьютерной программы Pro-sound (R.Seltzer, США). Измерения проводили на участке общей сонной артерии длиной 10 мм, непосредственно прилегающему к каротидному синусу. Содержание холестерина и триглицеридов в сыворотке крови определяли с помощью ферментативных наборов (Boehringer Mannheim GmbH, Германия). Уровень иммунного холестерина определяли по содержанию холестерина в ЦИК, выделенных из сыворотки крови путем преципитации иммунных комплексов полиэтиленгликолем 6000 [10]. Статистическую оценку значимости различий проводили с использованием пакета SPSS 10.1.7 (SPSS Inc., США).

## Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены исходные клинические и биохимические характеристики участников исследования. Для установления диагностической и прогностической значимости уровня иммунного холестерина и других липидных показателей, их пороговые значения для данной выборки были определены методом наибольшего  $\chi^2$ . Пороговое значение для иммунного холестерина составило 16 мкг/мл. У пациентов с повышенным уровнем иммунного холестерина также отмечалось повышенное содержание общего холестерина и холестерина ЛНП. Средняя и максимальная толщина

Таблица 1

Исходные клинические и биохимические показатели

Показатель	Все больные (n=98)	Х-ЦИК $\leq$ 16,0 мкг/мл (n=55)	Х-ЦИК $>$ 16,0 мкг/мл (n=43)
Толщина ИМС, мм	0,939 $\pm$ 0,015	0,920 $\pm$ 0,008	0,963 $\pm$ 0,018 *
Возраст, лет	60,6 $\pm$ 0,8	60,2 $\pm$ 0,5	61,1 $\pm$ 0,8
Общий холестерин, мг/дл	231 $\pm$ 4	224 $\pm$ 2	240 $\pm$ 3 *
Триглицериды, мг/дл	196 $\pm$ 10	203 $\pm$ 6	187 $\pm$ 9
Холестерин ЛВП, мг/дл	42,6 $\pm$ 1,1	42,0 $\pm$ 0,6	43,4 $\pm$ 1,0
Холестерин ЛНП, мг/дл	149 $\pm$ 4	141 $\pm$ 2	159 $\pm$ 3 *
Х-ЦИК, мкг/мл	14,9 $\pm$ 0,7	9,3 $\pm$ 0,6	22,1 $\pm$ 2,8 *

Примечание. \* — статистически значимое различие между больными с нормальным и повышенным уровнем Х-ЦИК,  $p < 0,05$

ИМС у пациентов с повышенным уровнем Х-ЦИК была достоверно выше, чем у пациентов с нормальным уровнем Х-ЦИК (табл. 1).

Анализ сопряженности липидных показателей с исходной толщиной ИМС сонных артерий выявил, что только уровни Х-ЦИК и холестерина ЛНП были достоверно сопряжены со степенью выраженности каротидного атеросклероза и при этом имели высокие значения относительного риска и отношения шансов (табл. 2).

Показатель Х-ЦИК имел наивысшую чувствительность и специфичность по сравнению с другими липидными параметрами, то есть обладал диагностической ценностью. Следует отметить, что такие показатели, как общий холестерин, холестерин ЛНП и липопротеидов высокой плотности (ЛВП), характеризовались чувствительностью, сравнимой с Х-ЦИК, но их специфичность была низкой. Уровень триглицеридов сыворотки крови не имел достоверной диагностической значимости.

Увеличение толщины ИМС сонных артерий составило в среднем  $0,029 \pm 0,011$  мм за 2 года наблюдения при исходной средней толщине ИМС  $0,939 \pm 0,015$  мм ( $p=0,028$ ). Таким образом, динамика изменений толщины ИМС может быть расценена как медленное, но статистически достоверное прогрессирование каротидного атеросклероза. Индивидуальные изменения толщины ИМС расценивались как прогрессирование, регрессия или стабильное состояние на основании статистически достоверных

различий между средними величинами трех измерений при включении и по завершении исследования. Прогрессирование атеросклероза было отмечено у 52 больных (53,1%). Спонтанная регрессия была отмечена у 21 больного (21,4%). Соответственно, у 25 больных (25,5%) за 2 года наблюдения толщина ИМС достоверно не изменилась.

Анализ сопряженности липидных показателей с динамикой изменений толщины ИМС выявил, что только уровень Х-ЦИК был достоверно сопряжен с прогрессированием каротидного атеросклероза и имел высокие показатели относительного риска и отношения шансов (табл. 3). Повышенный уровень Х-ЦИК наряду с повышенным общим холестерином и повышенным холестерином ЛНП имел достаточно высокую прогностическую значимость. Повышенный уровень триглицеридов сыворотки крови, как и сниженный уровень холестерина ЛВП, не имели прогностической значимости в отношении прогрессирования каротидного атеросклероза. Нормальный уровень Х-ЦИК (менее 16 мкг/мл) был единственным параметром, предвещающим отсутствие прогрессирования каротидного атеросклероза в течение 2 лет с прогностической значимостью 78,3% (табл. 3).

Нормальные уровни общего холестерина, холестерина ЛНП и ЛВП и триглицеридов не обладали достоверной прогностической ценностью.

В течение последних десятилетий активно изучалась роль ЛНП-содержащих ЦИК в атерогенезе. Наличие в крови аутоантител к ЛНП является ре-

Таблица 2

Диагностическая значимость липидных показателей и Х-ЦИК

Показатель	$\chi^2$	p	Относительный риск	Отношение шансов	Чувствительность, %	Специфичность, %
Х-ЦИК	8,490	0,045	1,18	1,43	64,7 (62,1–67,1)	60,1 (56,8–65,9)
Холестерин ЛНП	7,102	0,049	1,11	1,35	61,7 (56,5–66,8)	42,9 (38,8–47,0)
Холестерин ЛВП	3,987	0,159	1,12	1,33	61,8 (58,2–65,4)	45,3 (39,3–51,3)
Общий холестерин	1,605	0,373	1,11	1,20	61,6 (58,3–65,0)	45,7 (39,3–52,2)
Триглицериды	0,128	0,820	0,97	0,94	50,2 (39,9–61,0)	38,1 (34,1–42,2)

Примечание. В скобках указан 95%-ный доверительный интервал

Таблица 3

Прогностическая значимость липидных показателей и Х-ЦИК

Показатель	$\chi^2$	p	Относительный риск	Отношение шансов	Значимость повышенных показателей, %	Значимость нормальных показателей, %
Х-ЦИК	15,602	0,001	2,57	6,25	63,5 (53,6–71,5)	78,3 (67,1–87,3)
Холестерин ЛНП	0,031	0,904	0,96	0,92	72,4 (67,7–77,6)	58,1 (53,5–62,9)
Общий холестерин	0,031	0,904	0,97	0,91	64,3 (56,0–72,8)	39,0 (34,2–43,5)
Триглицериды	0,010	0,973	0,99	0,98	36,3 (31,0–41,3)	34,8 (30,1–39,0)
Холестерин ЛВП	0,008	0,986	1,00	1,00	48,0 (42,4–53,7)	43,4 (38,7–47,4)

Примечание. В скобках указан 95%-ный доверительный интервал

зультатом иммунного ответа организма на модификацию липопротеидов [19]. ЛНП-содержащие ЦИК были обнаружены в крови больных при атеросклерозе [9, 10, 13, 14]. Было установлено, что уровень Х-ЦИК в крови больных коронарным атеросклерозом повышен по сравнению со здоровыми лицами [14, 15]. Анализ физико-химических свойств ЛНП, входящих в состав ЛНП-содержащих ЦИК, показал, что антигеном для формирования подобных комплексов являются множественно-модифицированные (десиазированные) ЛНП [16]. ЛНП-содержащие ЦИК вызывают накопление холестерина в культивируемых клетках интимы аорты человека [15] и в макрофагах [4]. Удаление ЛНП-содержащих ЦИК из сыворотки крови больных атеросклерозом приводит к существенному снижению ее атерогенного потенциала [9, 14]. Поскольку накопление холестерина в клетках сопровождается стимуляцией других проявлений атерогенеза на клеточном уровне [8], то возможно, что присутствие ЛНП-содержащих ЦИК в крови способствует возникновению и прогрессированию атеросклеротического процесса в сосудистой стенке.

Однако некоторые авторы предполагают, что формирование ЦИК аутоиммунных комплексов модифицированный липопротеин низкой плотности — антигеном может носить защитный характер: такие комплексы обладают меньшей способностью индуцировать накопление эфиров холестерина в макрофагах по сравнению с исходными модифицированными липопротеинами и быстро элиминируются из кровотока [1].

В ряде исследований у больных с ишемической болезнью сердца (ИБС) выявлено повышение уровня ЦИК и показана их связь с течением ИБС и нарушениями липидного обмена, уровнями окисленных ЛНП [2, 18]. Согласно экспериментальным данным, ЦИК, в зависимости от изоформа входящих в их состав антигенов, способны индуцировать секрецию провоспалительных цитокинов, матриксных металлопротеиназ, генерацию кислородных радикалов [17]. Эти молекулярные механизмы определяют патофизиологическое значение ЦИК иммунных комплексов в развитии атеросклеротических поражений стенки сосуда.

Атерогенные свойства ЛНП-содержащих ЦИК позволяют предлагать использование Х-ЦИК в качестве биохимического маркера атеросклероза. Недавно была выявлена взаимосвязь между уровнем Х-ЦИК и наличием коронарных и экстракоронарных стенозов. Диагностическая значимость Х-ЦИК у больных с выраженными клиническими проявлениями атеросклероза оказалась выше, чем у широко используемых биохимических маркеров атеросклероза, таких, как общий холестерин и холестерин ЛНП, холестерин ЛВП и соотношение апоВ:апоА-I [10]. В настоящем исследовании диагностическая значи-

мость Х-ЦИК была оценена у пациентов с бессимптомным ранним атеросклерозом. Было установлено, что повышенный уровень Х-ЦИК ассоциирован с увеличенной толщиной ИМС сонных артерий, ультрасонографическим признаком раннего атеросклероза [3]. Чувствительность и специфичность Х-ЦИК оказалась наивысшей по сравнению с другими липидными параметрами.

Помимо диагностической значимости, повышенный уровень Х-ЦИК при раннем атеросклерозе имеет также и высокое прогностическое значение, сравнимое с повышенными уровнями общего холестерина и холестерина ЛНП. Следует отметить, что нормальный уровень Х-ЦИК оказался единственным высокозначимым биохимическим маркером, прогнозирующим отсутствие прогрессирования атеросклероза в течение 2 последующих лет.

Связь ЛНП-содержащих ЦИК с прогрессированием атеросклероза изучена недостаточно. Было показано, что титр антител к модифицированным ЛНП имеет прогностическую значимость в отношении острого инфаркта миокарда [11], но прогностическая ценность ЛНП-содержащих ЦИК не была оценена. Результаты недавнего 20-летнего проспективного исследования показали, что повышенный уровень ЦИК и антител к кардиолипину ассоциирован с риском инфаркта миокарда [5]. Тем не менее, состав ЦИК не был охарактеризован, поэтому невозможно сделать вывод об участии модифицированных ЛНП в формировании иммунных комплексов. В нашем исследовании впервые установлена прогностическая значимость ЛНП-содержащих ЦИК, определяемых по уровню Х-ЦИК, в отношении прогрессирования раннего атеросклероза.

Результаты данного исследования показывают, что содержание иммунного холестерина в крови не только является маркером раннего атеросклероза, но также имеет высокую прогностическую ценность. Тем не менее, требуются дальнейшие проспективные исследования для выявления атерогенной роли этого параметра.

*Работа была поддержана Министерством образования и науки РФ.*

### Список литературы

1. *Климов А.Н., Денисенко А.Д.* Может ли иммунная система защищать нас от атеросклероза? // Мед. акад. журн. — 2008. — Т. 8, №2. — С. 115–117.
2. *Bing H., Wang J., Zhang C., Cai H.* Positive correlation between in vivo oxidized LDL and LDL immune complexes // Clin. Biochem. — 2004. — Vol. 37, №1. — P. 72–75.

3. *Craven T.E., Ryu J.E., Espeland M.A.* et al. Evaluation of the associations between carotid artery atherosclerosis and coronary artery stenosis. A case-control study // *Circulation*. — 1990. — Vol. 82. — P. 1230—1242.
4. *Klimov A.N., Denisenko A.D., Vinogradov A.G.* et al. Accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with human lipoprotein-antibody autoimmune complex // *Atherosclerosis*. — 1988. — Vol. 74. — P. 41—46.
5. *Mustafa A., Nityanand S., Berglund L.* et al. Circulating immune complexes in 50-year-old men as a strong and independent risk factor for myocardial infarction // *Circulation*. — 2000. — Vol. 102. — P. 2576—2581.
6. *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.
7. *Orekhov A.N., Tertov V.V., Mukhin D.N., Mikhailenko I.A.* Modification of low density lipoprotein by desialylation causes lipid accumulation in cultured cells: discovery of desialylated lipoprotein with altered cellular metabolism in the blood of atherosclerotic patients // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1989. — Vol. 162. — P. 206—211.
8. *Orekhov A.N., Tertov V.V., Kudryashov S.A., Smirnov V.N.* Triggerlike stimulation of cholesterol accumulation and DNA and extracellular matrix synthesis induced by atherogenic serum or low density lipoprotein in cultured cells // *Circ. Res.* — 1990. — Vol. 66. — P. 311—320.
9. *Orekhov A.N., Kalenich O.S., Tertov V.V., Novikov I.D.* Lipoprotein immune complexes as markers of atherosclerosis // *Int. J. Tissue React.* — 1991. — Vol. 13. — P. 233—236.
10. *Orekhov A.N., Kalenich O.S., Tertov V.V.* et al. Diagnostic value of immune cholesterol as a marker for atherosclerosis // *J. Cardiovasc. Risk*. — 1995. — Vol. 2. — P. 459—466.
11. *Puurunen M., Manttari M., Manninen V.* et al. Antibody against oxidized low-density lipoprotein predicting myocardial infarction // *Arch. Intern. Med.* — 1994. — Vol. 154. — P. 2605—2609.
12. *Salonen R., Nyssonson K., Porkkala E.* et al. Kuopio Atherosclerosis Prevention Study (KAPS). A population-based primary preventive trial of the effect of LDL lowering on atherosclerotic progression in carotid and femoral arteries // *Circulation*. — 1995. — Vol. 92. — P. 1758—1764.
13. *Szondy E., Horvath M., Mezey Z.* et al. Free and complexed anti-lipoprotein antibodies in vascular diseases // *Atherosclerosis*. — 1983. — Vol. 49. — P. 69—77.
14. *Tertov V.V., Orekhov A.N., Kacharava A.G.* et al. Low density lipoprotein-containing circulating immune complexes and coronary atherosclerosis // *Exp. Mol. Pathol.* — 1990. — Vol. 52. — P. 300—308.
15. *Tertov V.V., Orekhov A.N., Sayadyan K.S.* et al. Correlation between cholesterol content in circulating immune complexes and atherogenic properties of CHD patients' serum manifested in cell culture // *Atherosclerosis*. — 1990. — Vol. 81. — P. 183—189.
16. *Tertov V.V., Sobenin I.A., Orekhov A.N.* et al. Characteristics of low density lipoprotein isolated from circulating immune complexes // *Atherosclerosis*. — 1996. — Vol. 122. — P. 191—199.
17. *Virella G., Atchley D., Koskinen S.* et al. Proatherogenic and proinflammatory properties of immune complexes prepared with purified human oxLDL antibodies and human oxLDL // *Clin. Immunol.* — 2002. — Vol. 105, №1. — P. 81—92.
18. *Wang J., Qiang H., Zhang C.* et al. Detection of IgG-bound lipoprotein(a) immune complexes in patients with coronary heart disease // *Clin. Chim. Acta.* — 2003. — Vol. 327, №1—2. — P. 115—122.
19. *Yla-Herttuala S., Palinski W., Rosenfeld M.E.* et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man // *J. Clin. Invest.* — 1989. — Vol. 84. — P. 1086—1095.

Поступила 01.12.11

#### Сведения об авторах:

Орехов Александр Николаевич, д-р биол. наук, зав. лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Мельниченко Александра Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., НИИ атеросклероза РАЕН

Собенин Игорь Александрович, д-р мед. наук, ФГБУ «НИИОПП» РАМН

В.А. Мясоедова<sup>1,2</sup>, Т.В. Кириченко<sup>1</sup>, В.А. Орехова<sup>1</sup>, И.А. Собенин<sup>2</sup>, Н.М. Мухамедова<sup>1</sup>, Д.М. Мартиросян<sup>1</sup>, В.П. Карагодин<sup>3</sup>, А.Н. Орехов<sup>1,2</sup>

## **Изучение толщины интимо-медиального слоя сонных артерий (ТИМ) как показателя естественного течения атеросклероза в московской популяции**

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт атеросклероза Российской Академии естественных наук, 143025, Москва, Инновационный Центр Сколково, ул. Новая, д.100

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова», 117997, Москва, Стремянный пер., 36

*Метод ультразвукового сканирования сонных артерий использован для определения толщины интимо-медиального слоя (ТИМ) в различных возрастных группах мужчин и женщин. Установлено, что возраст является ключевым фактором, определяющим степень развития атеросклероза в сонных артериях. У мужчин комплекс ТИМ был, как правило, выше, чем у женщин. У мужчин в возрасте от 51 года до 62 лет, а у женщин в возрасте от 58 лет до 70 лет скорость увеличения ТИМ резко возрастает. У мужчин старше 62 лет и женщин старше 70 лет скорость увеличения ТИМ заметно снижается. В возрастной группе старше 70 лет не отмечается достоверных различий между показателями ТИМ у мужчинами и женщинами.*

**Ключевые слова:** сонные артерии, толщина интимо-медиального слоя, ультразвуковое сканирование, атеросклероз, гендерные (половые) различия

V.A. Myasoedova<sup>1,2</sup>, T.V. Kirichenko<sup>1</sup>, V.A. Orekhova<sup>1</sup>, I.A. Sobenin<sup>2</sup>, N.M. Muhamedova<sup>1</sup>, D.M. Martirosyan<sup>1</sup>, V.P. Karagodin<sup>3</sup>, A.N. Orekhov<sup>1,2</sup>

## **Study of intima-medial thickness (IMT) of the carotid arteries as an indicator of natural atherosclerosis progress in Moscow population**

<sup>1</sup> Institute for Atherosclerosis Research, Russian Academy of Natural Sciences, Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Center, 143025, 100 Novaya Str., Moscow, Russia

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

<sup>3</sup> Plekhanov Russian University of Economics, 36, Stremyannyi per., Moscow, 117997, Russia

*A cross-sectional study of intima-medial thickness (IMT) of the carotid arteries in men and women in different age groups was performed as well as a prospective study of the dynamics of carotid IMT changes. It was shown that at the ages 40–70 years IMT is higher in men than in women, but at age after 70 such difference disappears due to acceleration of atherosclerosis progression in women, which starts after 58. Atherosclerosis progresses at uneven rate, both in men and women, and there are age periods characterized with different rate of IMT progression. In women, the most active progression of atherosclerosis starts 8 years later than in men, and is associated with the onset of late menopausal period.*

**Key words:** carotid arteries, intima-medial thickness, ultrasonic scanning, atherosclerosis, gender differences

От заболеваний атеросклеротического генеза в России ежегодно в общей сложности погибает около 1 300 000 чел. [7]. Субклинический (бессимптомный) атеросклероз является наиболее широко распространенной патологией; атеросклеротические поражения артерий выявляются уже у молодых лиц и неуклонно прогрессируют в течение десятилетий, прежде

чем приводят к развитию клинических проявлений. Уже в среднем возрасте у лиц без клинических проявлений атеросклероза частота выявления атеросклеротических поражений сосудов приближается к 100% [1, 8, 12]. Несмотря на существенные достижения в области медицины, арсенал эффективных терапевтических средств и адекватных целей антиатеросклеротической терапии остается весьма ограниченным. Одной из причин этого неблагоприятного дисбаланса является недостаточное количество верифицированных биомаркеров сердечно-сосудистых заболеваний

**Для корреспонденции:** Карагодин Василий Петрович, канд. биол. наук, доцент ФГБОУ ВПО «РЭУ им. Г.В. Плеханова». E-mail: vpk@mail.ru



(ССЗ). Наиболее перспективным в данном отношении биомаркером является метод ультразвукового сканирования сонных артерий, до недавнего времени остававшийся исключительно инструментом научных исследований. Относительная простота, неинвазивность, безопасность, воспроизводимость и высокая информативность данного метода позволяют своевременно выявлять условно здоровых лиц, предрасположенных к атеросклерозу.

*Цель исследования* — определение методом ультразвукового сканирования толщины интимо-медиального слоя (ТИМ) в различных возрастных группах мужчин и женщин.

### Методика

На базе 202 поликлиники МГУ г.Москвы было проведено кросс-секционное исследование ТИМ сонных артерий. В исследовании приняли участие 846 женщин и 422 мужчины, средний возраст которых составил 62 года. Для оценки сердечно-сосудистых рисков была использована модель Вейбулла и модели пропорциональных рисков Кокса. Для проведения биохимических анализов использовали сыворотку крови, полученную из венозной крови, взятой утром натощак. Содержание холестерина и триглицеридов определяли ферментативным методом с использованием наборов Boehringer Mannheim (Boehringer Mannheim GmbH, Germany). Для оценки состояния стенки сонных артерий использовали ультразвук высокого разрешения в В-режиме с использованием линейного сосудистого датчика с частотой 7,5 МГц. Протокол обследования включал сканирование левой и правой сонных артерий и области каротидного синуса с фокусировкой на задней стенке артерии в трех фиксированных проекциях — переднебоковой, боковой и заднебоковой [9]. Все измере-

ния проводили последовательно в течение одной сессии. Процедуру сканирования записывали в виде замороженных кадров в формате JPC на внешний носитель. Анализ записей проводил сертифицированный оператор, не участвовавший в процессе рандомизации. ТИМ измеряли с помощью компьютерной программы PROSOUND (R. Seltzer, USA). Измерения проводили на дистальном участке общей сонной артерии длиной 10 мм, противоположащем началу каротидного синуса. ТИМ задней стенки общей сонной артерии определяли как расстояние от ведущего края первой эхогенной зоны до ведущего края второй эхогенной зоны. Среднее значение трех измерений (в переднебоковой, боковой и заднебоковой проекциях) рассматривали как интегральный показатель (ТИМ). Кроме того, при ультразвуковом сканировании сонных артерий оценивали наличие атеросклеротических бляшек (АСБ) по 4-балльной системе (0 — отсутствие возвышенных атеросклеротических поражений; 1—2 — стабильные атеросклеротические бляшки со стенозом просвета сосуда до 20% и от 20 до 70% соответственно; 3 — гемодинамически значимые атеросклеротические бляшки со стенозированием более 70% просвета сонных артерий). Исследование проводили на аппарате SSI-1000 (Sonoscape, Китай).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы SPSS 14.0 (США). Графическую обработку данных проводили с использованием пакета SigmaPlot версии 7.0 (SPSS Inc., США). Достоверными считали различия при 95%-ной вероятности безошибочного прогноза. Характер распределения признака определяли с помощью F-теста и теста Колмогорова—Смирнова. После оценки вариабельности признака в отношении нормальности распределения для межгрупповых сравнений использовали тест Манна—Уитни или групповой t-тест, для оценки изменений показателей в динамике использо-

Таблица 1

Характеристики пациентов

Признак	Женщины	Мужчины	Различия между группами, p
Количество пациентов	846	422	
Средний возраст, годы	62±9	61±11	=0,040
Индекс массы тела, баллы	27±5	26±4	=0,009
Систолическое АД, мм рт.ст.	135±18	142±17	<0,001
Диастолическое АД, мм рт.ст.	82±10	86±10	<0,001
Сахарный диабет, кол-во человек (%)	36 (4,3)	23 (5,5)	>0,05
Гипертония, кол-во человек (%)	429 (51)	253 (60)	=0,002
Гипертрофия левого желудочка, кол-во человек (%)	197 (23,4)	91 (21,7)	>0,05
Общий холестерин, мг/дл	6,43±1,25	5,86±1,16	<0,001
ЛПВП, мг/дл	1,82±0,41	1,52±0,39	<0,001
ЛПНП, мг/дл	4,00±1,14	3,65±1,05	<0,001
Триглицериды, мг/дл	1,31±0,61	1,51±0,99	=0,001

вали тест Уилкоксона или парный t-тест. Для сравнения распределений номинальных показателей и категориальных величин использовали показатель  $\chi^2$  по Пирсону с поправкой по Йетсу. 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

Основные характеристики лиц, принявших участие в исследовании, представлены в табл. 1.

В обследованной группе индекс массы тела был достоверно ниже у мужчин, чем у женщин, показатели систолического и диастолического давления достоверно выше у мужчин, чем у женщин, наличие гипертонической болезни также было статистически значимо выше в группе мужчин. Мужчины отличались от женщин по всем показателям липидного профиля. Показатели общего холестерина, ЛПВП и ЛПНП были выше у женщин, чем у мужчин, только триглицериды были выше у мужчин. Различия по всем липидным показателям были статистически значимыми. Прямые показатели ультразвуковых характеристик представлены в табл. 2.

Показатель средней ТИМ был существенно выше у мужчин, выраженность атеросклеротического процесса была достоверно выше у женщин.

Для того чтобы определить, с какими факторами сердечно-сосудистого риска (средний возраст, индекс массы тела, систолическое АД, диастолическое АД, сахарный диабет, гипертония, гипертрофия левого желудочка, липидный профиль) соотносится показате-

ль ТИМ, был проведен корреляционный анализ, в результате которого было установлено, что наивысшие коэффициенты корреляции ТИМ как у мужчин, так и у женщин, связаны с возрастом. Следовательно, возраст является ключевым фактором, определяющим степень поражений сонных артериях, атеросклеротическим процессом.

В связи с этим был проведен анализ распределения ТИМ в различных возрастных группах и сравнительный анализ средних величин ТИМ по возрастным группам у мужчин и женщин. Результаты проведенного анализа представлены в табл. 3.

Из полученных данных следует, что в возрастной группе моложе 40 лет ТИМ больше у мужчин, чем у женщин, но это различие не является статистически значимым. В возрастных группах старше 40 лет и моложе 70 лет ТИМ существенно выше у мужчин, чем у женщин. В возрастной группе старше 70 лет не отмечается достоверных различий между мужчинами и женщинами по ТИМ.

Была измерена средняя теоретическая скорость увеличения ТИМ, у мужчин она составила  $7 \pm 1$  мкм в год, у женщин  $9 \pm 1$  мкм в год. Обращает на себя внимание нелинейная зависимость прогрессирования ТИМ от возраста. Так, в мужской группе отмечается умеренное прогрессирование ТИМ в возрастной группе до 50 лет, затем наблюдается большая скорость прогрессирования ТИМ, а к 62 годам скорость возрастания ТИМ снижается. В женской группе наблюдаются схожие изменения скорости прогрессирования ТИМ с возрастом. Так, до 58 лет сохраняется умеренное прогрессирование ТИМ, затем так же, как и у мужчин, скорость прогрессирования возрастает, и после 70 лет — снижается. Таким образом, были определены критические возрастные точки для мужчин и женщин, до и после которых скорость прогрессирования ТИМ различается.

Показатели ультразвуковых характеристик у мужчин и женщин

Таблица 2

Признак	Женщины	Мужчины	Различия между группами, p
Средняя ТИМ, мкм	812 $\pm$ 148	864 $\pm$ 155	<0,001
Наличие АСБ, баллы	0,77 $\pm$ 0,85	0,60 $\pm$ 0,78	=0,001

Сравнительный анализ ТИМ по возрастным группам у мужчин и женщин

Таблица 3

Возрастная группа	ТИМ, мкм, мужчины	ТИМ, мкм, женщины	Различия между группами, p
Моложе 40 лет	703 $\pm$ 101	638 $\pm$ 91	=0,086
41—50 лет	743 $\pm$ 118	688 $\pm$ 104	=0,006
51—60 лет	832 $\pm$ 139	751 $\pm$ 118	<0,001
61—70 лет	913 $\pm$ 142	849 $\pm$ 132	<0,001
Старше 70 лет	945 $\pm$ 145	921 $\pm$ 141	=0,254

Теоретическая скорость увеличения ТИМ в год у мужчин и женщин

Возрастная группа	Скорость прогрессирования ТИМ (за год), мкм	Различия между группами, р
Мужчины до 50 лет	5±2	<0,05
Мужчины от 51 года до 62 лет	11±3	=0,001
Мужчины старше 62 лет	3±2	>0,05
Женщины до 58 лет	6±1	<0,001
Женщины от 59 до 70 лет	9±1	<0,05
Женщины старше 70 лет	4±3	<0,05

С целью проверки предположения о характере прогрессирования ТИМ, был проведен регрессионный анализ скорости изменения ТИМ за год. Результаты анализа представлены в табл. 4.

В результате проведенного анализа было продемонстрировано, что у мужчин до 50 лет и у женщин до 62 лет теоретическая скорость увеличения ТИМ умеренная, что свидетельствует об умеренном прогрессировании ТИМ. У мужчин в возрасте от 51 года до 62 лет, а также у женщин в возрасте от 58 лет до 70 лет расчетная скорость увеличения ТИМ резко возрастает, что свидетельствует о высокой степени прогрессирования ТИМ в обеих группах. И, наконец, у мужчин старше 62 лет и женщин старше 70 лет теоретическая скорость увеличения ТИМ заметно снижается. Такое снижение скорости увеличения ТИМ в старшей группе как у мужчин, так и у женщин свидетельствует о существенном замедлении прогрессирования ТИМ.

В результате проведенного кросс-секционного исследования по изучению показателя ТИМ сонных артерий было установлено, что показатель средней ТИМ был существенно выше у мужчин, а выраженность атеросклеротического поражения — у женщин. Подобные данные демонстрируют и ряд других клинических исследований, направленных на изучение изменений показателя ТИМ и клинической значимости этого показателя [3, 4, 10]. В результате этих исследований у мужчин в любом возрасте комплекс ТИМ был достоверно выше, чем у женщин. По нашим данным, наивысшие коэффициенты корреляции ТИМ с факторами риска как у мужчин, так и у женщин связаны с возрастом, следовательно, возраст является ключевым фактором, определяющим степень развития атеросклероза в сонных артериях. Тем самым мы подтвердили данные исследователей, установивших, что у женщин в соответствующих возрастных группах показатели ТИМ ниже, чем у мужчин, и что ТИМ увеличивается с возрастом, независимо от половой принадлежности [2]. В проведенном нами исследовании в возрастной группе моложе 40 лет ТИМ больше у мужчин, чем у женщин, но это различие не является статистически значимым. В возрастных группах стар-

ше 40 лет и моложе 70 лет показатель ТИМ существенно выше у мужчин, чем у женщин. В возрастной группе старше 70 лет не отмечается значимых различий показателей ТИМ у мужчин и женщин. Эти результаты сопоставимы с данными авторов, установивших, что у пациентов старше 65 лет половые различия в увеличении ТИМ не были существенными [5]. Более того, было показано, что половые различия в показателе ТИМ исчезают полностью у пациентов, перенесших инсульт или инфаркт. Объяснением этого факта может быть ускорение развития атеросклеротического процесса в постменопаузальный период у женщин [6, 11], и к определенному возрасту показатель ТИМ у женщин не отличается от такового у мужчин, несмотря на то, что развитие атеросклероза у них начинается позже.

Таким образом, в возрасте от 40 до 70 лет ТИМ у мужчин больше, чем у женщин, а после 70 лет эти различия нивелируются из-за ускорения прогрессирования атеросклероза у женщин, начиная с 58-летнего возраста.

*Работа была поддержана Министерством образования и науки РФ.*

### Список литературы

1. *Berenson G.S., Srinivasan S.R., Bao W.* Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults // *N. Engl. J. Med.* — 1998. — Vol. 338. — P. 1650—1656.
2. *Chambless L.E., Heiss G., Folsom A.R.* et al. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study, 1987—1993 // *Am. J. Epidemiol.* — 1997. — Vol. 146. — P. 483—494.
3. *Heiss G., Sharet A.R., Barnes R.* et al. Carotid atherosclerosis measured by B-mode ultrasound in populations: association with cardiovascular risk factors in the ARIC study // *Am. J. Epidemiol.* — 1991. — Vol. 134. — P. 250—256.
4. *Held C., Hjerdahl P., Eriksson S.V.* et al. Prognostic implications of intima-media thickness and plaques in the carotid and femoral arteries in patients with stable angina pectoris // *Eur. Heart J.* — 2001. — Vol. 22. — P. 11—14.

5. *Kablak-Ziembicka A., Przewlocki T., Tracz W.* et al. Gender Differences in Carotid Intima-Media Thickness in Patients With Suspected Coronary Artery Disease // *Am. J. Cardiol.* — 2005. — Vol. 96. — P. 1217–1222.

6. *Lassila H.C., Sutton-Tyrrell K., Matthews K.A.* et al. Prevalence and determinants of carotid atherosclerosis in healthy postmenopausal women // *Stroke.* — 1997. — Vol. 28. — P. 513–517.

7. *Marcovina S.M., Crea F., Davignon J.* et al. Biochemical and bioimaging markers for risk assessment and diagnosis in major cardiovascular diseases: a road to integration of complementary diagnostic tools // *J. Int. Med.* — 2007. — Vol. 261. — P. 214–234.

8. *McGill H.C., Herderick E.E., McMahan C.A.* et al. Atherosclerosis in youth // *Minerva Pediatr.* — 2002. — Vol. 54. — №5. — P. 437–447.

9. *Salonen R., Nyssonen K., Porkkala E.* et al. Atherosclerosis Prevention Study (KAPS). A population-based primary preventive trial of the effect of LDL lowering on atheros-

clerotic progression in carotid and femoral arteries // *Circulation.* — 1995. — Vol. 92. — №7. — P. 1758–1764.

10. *Sun Y., Lin C.H., Lu C.J.* et al. Carotid atherosclerosis, intima media thickness and risk factors—an analysis of 1781 asymptomatic subjects in Taiwan // *Atherosclerosis.* — 2002. — Vol. 164. — P. 89–94.

11. *Sutton-Tyrrell K., Lassila H.C., Meilahn E.* et al. Carotid atherosclerosis in premenopausal and postmenopausal women and its association with risk factors measured after menopause // *Stroke.* — 1998. — Vol. 29. — P. 1116–1121.

12. *Tuzcu E.M., Kapadia S.R., Tutar E.* High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound // *Circulation.* — 2001. — Vol. 103. — P. 2705–2710.

Поступила 10.10.11

#### Сведения об авторах:

Орехов Александр Николаевич, д-р биол. наук, зав. лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Собенин Игорь Александрович, д-р мед. наук, ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Мартиросян Даник Михайлович, канд. мед. наук ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Мясоедова Вероника Александровна, канд. мед. наук ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Мухамедова Нигора Мамедовна, канд. хим. наук НИИ атеросклероза РАЕН

Н.А. Боброва, М.В. Микитюк, Л.А. Куценко, И.П. Кайдашев

## **Влияние фуллерена C<sub>60</sub> на процессы свободнорадикального окисления липидов при экспериментальной бронхиальной астме**

Научно-исследовательский институт генетических и иммунологических основ развития патологии и фармакогенетики Высшего государственного учебного заведения Украины «Украинская медицинская стоматологическая академия», Украина, 36024, Полтава, ул. Шевченка, 23

*На модели бронхиальной астмы изучено состояние перекисного окисления липидов и активности антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и каталазы при сенсibilизации мышей овальбумином, их коррекция фуллереном FC<sub>60</sub> и его модифицированными и конъюгированными с овальбумином формами (FC<sub>60</sub>-ОВА, mFC<sub>60</sub>, mFC<sub>60</sub>-ОВА). Показано, что сенсibilизация мышей овальбумином приводит к повышению процессов перекисного окисления липидов тканей и снижению активности антиоксидантных ферментов в легких и селезенке. Используемые разные формы фуллеренов при данной патологии проявили антиоксидантный эффект и модифицирующее влияние на ферменты антиоксидантной защиты. Наиболее эффективно проявилось влияние фуллерена FC<sub>60</sub> и его модифицированной формы (1,2-метанофуллерен-C<sub>60</sub>)-61-карбоксилат. Полученные результаты свидетельствуют о перспективах дальнейшего исследования фуллеренов как потенциальных лекарственных препаратов.*

**Ключевые слова:** фуллерены, бронхиальная астма, перекисное окисление липидов, супероксиддисмутаза, каталаза

N.A. Bobrova, M.V. Mikitiuk, L.A. Kutsenko, I.P. Kaidashev

## **Fulleren C<sub>60</sub> influence on lipids free-radical processes at bronchial asthma**

Scientific Research Institute of Genetic and Immunological Grounds of Pathology and Pharmacogenetic the Higher State Educational Establishment of Ukraine «Ukrainian Medical Stomatological Academy», 23, Shevtchenko str., Poltava, 36024, Ukraine

*Lipids peroxidative oxidation as well as antioxidative enzymes superoxidedismutase and catalase activity state at the mice sensibilization with ovalbumine, its correction with fullerene FC<sub>60</sub> as well as by its forms (FC<sub>60</sub>-OVA, mFC<sub>60</sub>, mFC<sub>60</sub>-OVA) modified and conjugated with ovalbumines have been studied. It has been demonstrated that the mice sensibilization with ovalbumin leads to the tissues peroxidative lipid oxidation processes enforcement as well as lowering antioxidative enzymes activity in lungs and spleen. Used different fullerene forms expressed antioxidative effect and modifying effect to antioxidative protection enzymes at a given pathology. The influence of fullerene FC<sub>60</sub> and its modified form (1,2-methanofulleren-C<sub>60</sub>)-61-carboxylic acid was the mostly effective. The data received testify to the prospects of the fullerenes further investigation as the potential medicines.*

**Key words:** fullerenes, bronchial asthma, lipids peroxidative oxidation, superoxidedismutase, catalase

Известно, что нарушения в системах перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантной защиты (АОЗ) организма имеют существенное значение в развитии и прогрессировании бронхиальной астмы [2—4, 10, 12, 25]. Накопленные данные о роли свободнорадикального окисления (СРО) при бронхиальной астме подтверждают, что антиоксидантная (АО) терапия необходима для оптимизации лечения этого заболевания [20, 21]. Одним из новых путей такой терапии может быть применение наночастиц.

Перспективным для практической медицины является применение фуллеренов — класса новых углеродных аллотропов. На данный момент синтезированы многочисленные производные фуллеренов C<sub>60</sub> (FC<sub>60</sub>), в том числе водорастворимые. Разработаны разнообразные способы получения наносuspензий чистого фуллерена [15, 22]. Известны антиоксидантные свойства фуллеренов [17, 28]. Фуллерены связывают активные формы кислорода, образующиеся в клетке под действием радиационного облучения, пероксиды и гидроксильные радикалы, не допуская разрушения ими структур [9, 17].

Окислительно-восстановительную активность фуллеренов обуславливают липофильность, определя-

**Для корреспонденции:** Боброва Нелля Александровна, канд. биол. наук, старш. научн. сотр. ВГУЗУ «УМСА» НИИ ГИОРПФ. E-mail: congres2007@yandex.ru

ющая мембранотропные свойства [16]; электронодефицитность, определяющая способность взаимодействовать со свободными радикалами [11]; способность передавать энергию молекуле обычного кислорода и превращать его в синглетный кислород [13]. При определенных условиях фуллерены могут выступать как сильные окислители, обладая цитотоксичностью, связанной с индукцией ПОЛ [8]. Однако при химической модификации фуллеренов гидроксильными или карбоксильными группами наночастицы теряют токсичность вследствие повышения гидрофильности [19]. Маленький размер фуллеренов и возможность присоединения к ним лекарственных средств и других лигандов, которые придают им органотропность, делает их перспективными для использования в качестве лечебных и профилактических средств при бронхиальной астме [7, 14, 17, 22, 30].

*Цель исследования* — изучение влияния разных форм фуллерена  $C_{60}$  на процессы СРО при экспериментальной бронхиальной астме (ЭБА).

### Методика

Исследование выполнено на 36 мышах BALB/c в возрасте 6 недель. Все животные были разделены на 6 групп. Интактные животные составили 1-ю группу. В остальных группах у животных воспроизводили ЭБА путем внутрибрюшинной сенсibilизации животных раствором овальбумина (ОВА, Sigma, USA) в стерильном физиологическом растворе. Сенсibilизацию проводили на 1-е и 14-е сут. На 24—26-е сут. животным вводили ОВА в виде аэрозоля, генерируемого с 1% ОВА в стерильном физиологическом растворе с помощью ультразвукового ингалятора «Муссон-2» (ФГУП «Алмаз», г.Ростов-на-Дону, Россия) в течение 40 мин в специальной камере. За 1 ч до каждой ингаляции животным вводили внутрибрюшинно исследуемые формы фуллеренов в виде дисперсии или растворов в дозе 50 нг [26]. Животным 2-й группы (контроль) вместо фуллерена вводили физиологический раствор (ОВА группа). В 3-й группе мышам вводили дисперсию  $FC_{60}$  (ОВА- $FC_{60}$  группа), 4-й — водную дисперсию  $FC_{60}$  в смеси с ОВА (ОВА- $FC_{60}$ -ОВА группа), 5-й — раствор модифицированного фуллерена (1,2-метанофуллерен- $C_{60}$ )-61 карбоксилацид (ОВА- $mFC_{60}$  группа), 6-й — раствор модифицированного фуллерена, конъюгированного с ОВА (ОВА- $mFC_{60}$ -ОВА группа) [29]. Контрольной группе вводили физиологический раствор. Через 30 мин после последней ингаляции проводили эвтаназию животных путем цервикальной дислокации.

Для исследования влияния  $FC_{60}$  на процессы свободнорадикального окисления (СРО) при ЭБА полу-

чали водную дисперсию фуллереновых частиц  $C_{60}$  размером 10—200 нм, поверхности которых состояли из гидратированных фуллеренов. При приготовлении водной дисперсии фуллерена за основу был взят метод E. Oberdoster с соавторами [24]. Кристаллический стерильный фуллерен  $C_{60}$  (Sigma, USA) перемешивали на магнитной мешалке со стерильной деионизированной водой в асептических условиях в течение 2 мес. при комнатной температуре. Водную дисперсию готовили из расчета конечной концентрации 50 нг на животное. Контроль за чистотой препарата проводили в первую и последнюю неделю приготовления водной дисперсии  $FC_{60}$  путем ее посева на тиогликолевую среду, среду Сабуро и питательный агар [1]. К водной дисперсии  $FC_{60}$  добавляли раствор ОВА с конечной концентрацией 10,4 г/л.

Для приготовления раствора модифицированного фуллерена  $mFC_{60}$  реагент (1,2-метанофуллерен- $C_{60}$ )-61 карбоксилацид (Sigma, USA) массой 1,5 мг растворяли в 0,25 мл пиридина, в него добавляли 8 мг N-гидроксисукцинимид (Sigma, USA). Дициклогексилкарбодимид (Fluka) растворяли в 0,15 мл пиридина и добавляли в раствор фуллерена  $mFC_{60}$ . Смесь оставляли при комнатной температуре на 48 ч. Затем медленно добавляли в 1 мл раствора ОВА (Sigma, USA) с концентрацией белка 10,4 г/л при pH 9,5. Уровень pH регулировали 1M гидрокарбонатом натрия. Смесь оставляли на 4 ч при комнатной температуре и диализировали против фосфатно-солевого буфера при температуре 4°C в течение ночи [18].

В гомогенатах образцов легких, печени и селезенки определяли:

1) уровень продуктов ПОЛ по содержанию веществ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактанты);

2) их накопление при инкубации гомогенатов в прооксидантном буфере pH 7,4, в состав которого входят (Мм) 16 трис основной, 50 мл 100 HCl, 7,9 аскорбиновой кислоты, 12  $Fe_2SO_4 \times 7H_2O$ ;

3) — показатели ферментативного звена АОЗ — активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы [5].

Статистическая обработка полученных данных проведена с помощью стандартного пакета Statistica 6.0.

### Результаты и обсуждение

Установлено, что при инкубации в прооксидантной среде гомогената легких интактных животных прирост концентрации ТБК-реактантов составлял 18% (рис. 1). В контрольной группе животных с ЭБА (2-я группа) этот показатель достоверно возрастал в 2,4 раза. Введение водного раствора фуллерена  $FC_{60}$  животным с ЭБА приводило к существенному снижению прироста ТБК-реактантов как по сравнению с по-

казателями контрольных животных (в 4,5 раза), так и с показателями интактных (в 1,9 раза). В группе животных ОВА-FC<sub>60</sub>-ОВА прирост ТБК-реактантов в гомогенате легких составлял 33%, что также было статистически значимо ниже, чем у животных с ЭБА. Введение фуллерена (группа ОВА-mFC<sub>60</sub>) характеризовалось уменьшением прироста ТБК-реактантов в 2,4 раза по сравнению с контролем. Применение модифицированного фуллерена, конъюгированного с ОВА (mFC<sub>60</sub>-ОВА), меньше влияло на прирост ТБК-реактантов в гомогенатах легких и характеризовалось лишь тенденцией к снижению этого показателя по сравнению с контрольной группой.

Инкубация гомогенатов печени в прооксидантном буфере выявила достоверное увеличение прироста ТБК-реактантов у мышей, sensibilizированных ОВА, в 1,6 раза по сравнению с интактными животными (рис. 2). Предварительное введение этим животным водного раствора FC<sub>60</sub> не вызвало достоверных изменений по сравнению с контролем. Введение других форм фуллеренов (FC<sub>60</sub>-ОВА, mFC<sub>60</sub>, mFC<sub>60</sub>-ОВА) существенно снижало прирост ТБК-реактантов в среднем на 16—18%, что привело к нормализации процессов ПОЛ в печени.

При инкубации гомогенатов селезенки в прооксидантном буфере у животных с ЭБА наблюдался существенный рост концентрации ТБК-реактантов в 2,2 раза (рис. 3). Введение опытным животным водного раствора фуллерена FC<sub>60</sub> и его модифицированной формы mFC<sub>60</sub> существенно тормозило накопление ТБК-реактантов в гомогенатах селезенки при их инкубации по сравнению с контролем (в 1,68 и 1,77 раза соответственно). Фуллерен FC<sub>60</sub> в смеси с ОВА и его модифицированная конъюгированная с ОВА форма (mFC<sub>60</sub>-ОВА) не влияли на прирост ТБК-реактантов в тканях селезенки.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что при ЭБА в гомогенатах тканей животных усиливаются процессы ПОЛ, уменьшается устойчивость субстратов к липопероксидации, что является результатом системных нарушений окислительно-восстановительного баланса в организме. При введении этим животным различных форм фуллеренов наиболее выраженное действие оказывают «свободные» фуллерены: водный раствор FC<sub>60</sub> и его модифицированная форма mFC<sub>60</sub>.

При исследовании активности ферментов АОЗ, было выявлено, что активность СОД в легких sensibilizированных животных существенно не менялась (табл.). Предварительное введение водного раствора фуллерена FC<sub>60</sub>, FC<sub>60</sub> в смеси с ОВА (FC<sub>60</sub>-ОВА) и модифицированной формы (mFC<sub>60</sub>) не влияло на активность данного фермента в ткани легких. Введение модифицированного фуллерена, конъюгированно-

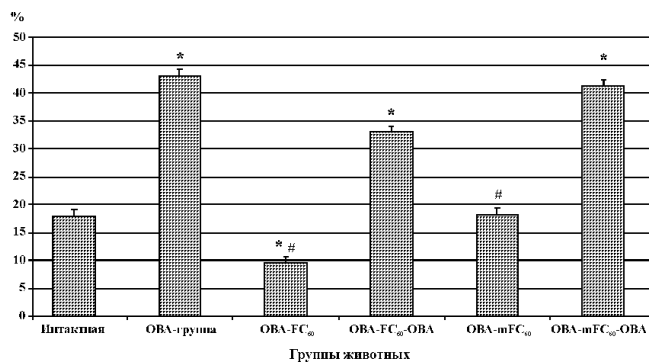


Рис. 1. Влияние фуллеренов на прирост ТБК-реактантов в гомогенатах легких при экспериментальной бронхиальной астме: по оси ординат — прирост ТБК-реактантов (%); по оси абсцисс — группы животных; \* достоверность (p<0,05) по сравнению с интактными животными; # достоверность (p<0,05) по сравнению с контролем (ОВА-группой)

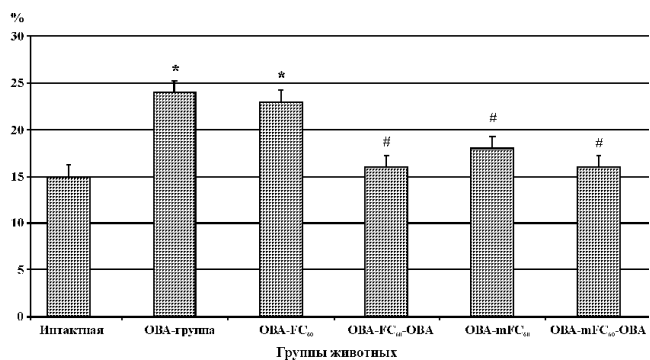


Рис. 2. Влияние фуллеренов на прирост ТБК-реактантов в гомогенатах печени при экспериментальной бронхиальной астме: по оси ординат — прирост ТБК-реактантов (%); по оси абсцисс — группы животных; \* достоверность (p<0,05) по сравнению с интактными животными; # достоверность (p<0,05) по сравнению с контролем (ОВА-группой)

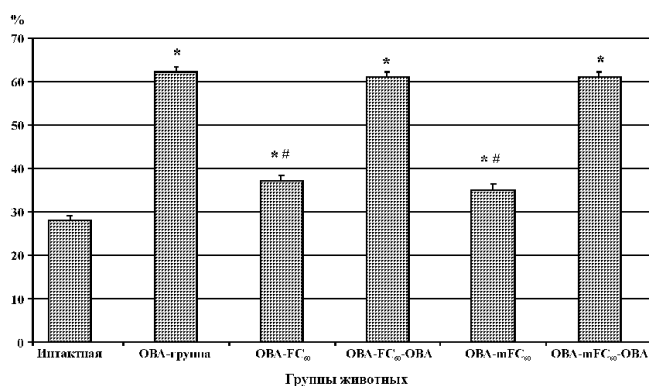


Рис. 3. Влияние фуллеренов на прирост ТБК-реактантов в гомогенатах селезенки при экспериментальной бронхиальной астме: по оси ординат — прирост ТБК-реактантов (%); по оси абсцисс — группы животных; \* достоверность (p<0,05) по сравнению с интактными животными; # достоверность (p<0,05) по сравнению с контролем (ОВА-группой)

Влияние фуллерена C<sub>60</sub> на активность антиоксидантных ферментов при экспериментальной бронхиальной астме (M±m), (n=6)

Группы животных	Супероксиддисмутаза, Ед/г			Каталаза, у.ед		
	Легкие	Печень	Селезенка	Легкие	Печень	Селезенка
Интактная	3,77±0,17	6,3±0,28	2,27±0,22	4,94±0,12	16,96±0,60	2,08±0,23
ОВА-группа (контроль)	3,46±0,14	8,15±0,48 *	1,82±0,29	4,09±0,11 *	16,60±0,88	1,32±0,12 *
ОВА-FC <sub>60</sub>	3,23±0,17 *	8,0±0,68	2,27±0,12	4,65±0,20 * #	17,06±0,54	1,58±0,10 * #
ОВА-FC <sub>60</sub> -ОВА	3,68±0,18	9,25±0,24 * #	2,07±0,19	3,75±0,24 * #	16,48±0,54	1,63±0,21 #
ОВА-mFC <sub>60</sub>	3,19±0,18	7,1±0,10 * #	2,03±0,21	3,71±0,14 * #	16,26±0,76	1,42±0,21
ОВА-mFC <sub>60</sub> -ОВА	2,80±0,3 * #	6,95±0,13 #	1,84±0,20	3,32±0,16 #	17,04±0,74	1,16±0,11

Примечание. \* —  $p < 0,05$  по сравнению с интактной группой; # —  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой (обозначена ОВА-группа)

го с ОВА (mFC<sub>60</sub>-ОВА), приводило к существенно-му снижению показателя в 1,3 и 1,2 раза по сравнению с интактной и контрольной группами соответственно.

Исследование активности СОД в гомогенатах печени показало, что моделирование ЭБА сопровождалось увеличением активности СОД в 1,3 раза по сравнению с интактными животными (таблица). Предварительное введение фуллерена FC<sub>60</sub> сенсibilизированным ОВА животным не вызвало изменений активности СОД в тканях печени. Введение фуллерена FC<sub>60</sub> в смеси с ОВА приводило к достоверному росту активности фермента по сравнению с показателями контрольной группы. При введении модифицированного фуллерена (mFC<sub>60</sub>) и его конъюгированной формы (mFC<sub>60</sub>-ОВА) отмечено выраженное снижение активности СОД по сравнению с показателями животных с ЭБА до уровня интактной группы.

Активность СОД в тканях селезенки на фоне ЭБА достоверно не изменялась (таблица). Введение разных форм фуллеренов этим животным также не выявило достоверных изменений данного показателя.

При исследовании активности каталазы в тканях легких выявлено ее снижение у животных с ЭБА в 1,2 раза по сравнению с показателями интактных животных (таблица). Введение фуллерена FC<sub>60</sub> приводило к достоверному повышению активности каталазы. Смесь фуллерена FC<sub>60</sub> с ОВА и его модифицированная форма (FC<sub>60</sub>-ОВА, mFC<sub>60</sub>) существенно снижала активность фермента по сравнению с интактной и контрольной группой в 1,3 и 1,1 раза соответственно. Введение модифицированного фуллерена, конъюгированного с ОВА (mFC<sub>60</sub>-ОВА), приводило к дальнейшему снижению данного показателя.

Активность каталазы в печени животных, сенсibilизированных ОВА, достоверно не изменялась. Введение всех исследуемых форм фуллеренов этим животным также не привело к статистически значимым изменениям активности фермента.

При изучении влияния разных форм фуллеренов на активность каталазы в селезенке животных с ЭБА нами отмечено снижение данного показателя в 1,6 раза по сравнению с интактными животными (таблица). Введение чистого фуллерена FC<sub>60</sub> и его смеси с ОВА (FC<sub>60</sub>-ОВА) сенсibilизированным животным достоверно повышало активность каталазы. Введение модифицированного фуллерена и конъюгированного с ним ОВА (mFC<sub>60</sub>, mFC<sub>60</sub>-ОВА) существенно не влияло на ее активность.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что сенсibilизация животных ОВА приводит к усилению СРО липидов, которое проявляется в повышении прироста ТБК-реактантов в тканях животных и изменении активности основных энзимов АОЗ — СОД и каталазы. Данный факт подтверждает наличие дисбаланса в оксидантно-антиоксидантной системе животных, обусловленного развитием ЭБА [23, 27, 31].

Последовательность включения и взаимодействия молекулярно-клеточных механизмов, индуцирующих ПОЛ при данной патологии, на основе собственных наблюдений и данных литературы [4, 6] можно представить следующим образом. Уже на ранней стадии гипоксии включается механизм активации ПОЛ электронно-транспортными переносчиками. При блокаде конечного звена дыхательной цепи в условиях ишемической гипоксии происходит разгрузка дыхательной цепи от электронов, которые постоянно его пополняют, за счет оттока электронов на пути к цитохромоксидазе. Причиной образования супероксидных анион-радикалов и перекиси водорода в тканях при бронхиальной астме является одноэлектронное восстановление кислорода на убихиноне под воздействием электронов, не достигших цитохромоксидазы.

Из литературных источников известна способность фуллеренов регулировать СРО путем нейтрализации только избытка свободных радикалов без уменьшения их количества, которое необходимо для



нормального функционирования биологической системы [16, 32]. Это подтверждается использованием фуллерена  $FC_{60}$  на фоне ЭБА, когда под его влиянием эффективно снижался прирост ТБК-реактантов, особенно в тканях легких и селезенке.

Считается, что АО свойства фуллеренов связаны с их структурой и (или) модификацией физико-химических свойств водной среды. Это положение в достаточной мере объясняет тот факт, что в наших исследованиях АО свойства проявили все исследуемые формы фуллеренов.

Цель, с которой проводится конъюгация фуллеренов, с одной стороны, преследует выбор наночастиц для доставки лекарственных веществ в клетки и/или органы-мишени [22, 33], с другой, — это направление модификации аллергенов для изменения их иммуногенных и аллергенных свойств и последующего применения их с целью специфической иммунотерапии [27, 34]. Основываясь на этих данных, в нашей работе были использованы конъюгированные формы фуллеренов для уточнения механизмов их действия при ЭБА. Нами выявлено, что модифицированный фуллерен, конъюгированный с ОВА ( $mFC_{60}$ -ОВА), был менее эффективным в подавлении ПОЛ в легких и селезенке. Можно предположить, что конъюгация влияет на транспорт фуллеренов и их гидратацию и таким образом ограничивает АО активность этих соединений в определенных тканях и органах.

В проведенных исследованиях фуллерен  $FC_{60}$ , его смесь с ОВА, модифицированная форма ( $mFC_{60}$ ) и модифицированная конъюгированная форма ( $mFC_{60}$ -ОВА) имели влияние не только на уровень ПОЛ, но и на активность АО ферментов. Действие их было неоднозначным и зависело от вида фермента, органа и формы используемого фуллерена. Это дает возможность предположить, что происходит прямая модификация ферментов, в которой существенную роль играют замещенные группы и присоединенные вещества [17, 28].

Таким образом, ЭБА характеризуется усилением ПОЛ и снижением активности СОД и каталазы в тканях. Все использованные при этой экспериментальной патологии фуллерены (особенно фуллерен  $FC_{60}$  и его модифицированная форма (1,2-метанофуллерен- $C_{60}$ )-61-карбоксилаид) выявили АО эффект и неоднозначное модифицирующее влияние на ферменты АОЗ, что дает основание считать первый эффект присущим коровой структуре фуллерена  $FC_{60}$ , а второй — модифицирующим факторам (радикалам и конъюгированным соединениям). Полученные в нашем исследовании данные свидетельствуют о перспективах дальнейшего исследования фуллеренов как потенциальных лекарственных веществ.

## Список литературы

1. Испытание на стерильность / М.Д. Машковский, Э.А. Бабаян, А.Н. Обоймакова и др. // Государственная фармакопея СССР. В 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. — 11-е изд-е. — М.: Медицина, 1990. — С. 187—188.
2. *Лаврентьев О.В., Воронина Л.П., Дубина Д.Ш.* и др. Свободнорадикальное окисление белков и липидов при бронхиальной астме // Современные проблемы науки и образования. — 2008. — №6. — С. 20.
3. *Лаврентьева Л.П., Дубина Д.Ш., Полунина О.С.* и др. Диагностическая ценность исследования перекисного окисления белков, липидов и антиоксидантной защиты организма при бронхиальной астме в динамике // Успехи современного естествознания. — 2009. — №3. — С. 23—26.
4. *Лихович В.В., Вавилин В.А., Макарова С.И.* Роль ферментов биотрансформации в предрасположенности к бронхиальной астме и формировании особенностей ее клинического фенотипа // Вестник РАМН. — 2000. — №12. — С. 36—41.
5. Методы клинических и экспериментальных исследований в медицине / Л.В. Беркало, О.В. Бобович, Н.А. Боброва и др. / Под ред. И.И. Кайдашева. — Полтава: Полимет, 2003. — 320 с.
6. Механизмы обструкции бронхов / Г.Б. Федосеев. — СПб.: Мед. информ. агенство, 1995. — 333 с.
7. *Онищенко Е.Н.* Фуллерены как антиоксиданты // Бюллетень ПерсТ. — 2002. — №22. — С. 1.
8. *Пиотровский Л.Б.* Фуллерены в дизайне лекарственных веществ // Российские нанотехнологии. — 2007. — Т. 2, №7—8. — С. 6—18.
9. *Пиотровский Л.Б., Еропкин М.Ю., Еропкина Е.М.* и др. Механизмы биологического действия фуллеренов — зависимость от агрегатного состояния // Психофармакология и биологическая наркология. — 2007. — Т. 7. — Вып. 2. — С. 58—62.
10. *Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В.* Значение баланса прооксидантов и антиоксидантов — равнозначных сторон метаболизма // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2007. — №3. — С. 2—18.
11. *Соколов В.И.* Химия фуллеренов — новых аллотропных модификаций углерода // Известия академии наук. Сер. химия. — 1999. — №7. — С. 1211—1218.
12. *Соодаева С.К.* Окислительный стресс и антиоксидантная терапия при заболеваниях органов дыхания // Пульмонология. — 2006. — №5. — С. 122—125.
13. Фундаментальные направления молекулярной медицины / Л.Б. Пиотровский — СПб.: Росток, 2005. — С. 195—268.
14. *Шимановский Н.Л.* Нанотехнологии в современной фармакологии // Международный медицинский журнал. — 2009. — Т. 15, №1. — С. 57—59.
15. *Ширинкин С.В., Чурносоев М.И., Андриевский Г.В.* и др. Перспективы использования фуллеренов в качестве антиоксидантов в патогенетической терапии бронхиальной астмы // Клиническая медицина. — 2009. — №5. — С. 56—58.
16. *Andrievsky G.V., Klochkov V.K., Derevyanchenko L.I.* Is  $C_{60}$  fullerene molecule toxic?! Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures // Chem. Sos. Commun. — 2005. — Vol. 13, №4. — P. 363—376.
17. *Bosi S., Da Ros T., Spalluto G.* et al. Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications // Eur. J. Med. Chem. — 2003. — Vol. 38. — P. 913—923.
18. *Chen B.X., Wilson S.R., Das M.* et al. Antigenicity of fullerenes: Antibodies specific for fullerenes and their characteristics // Immunology. — 1998. — Vol. 95. — P. 10809—10813.

19. *Hopkin M.* Flies get a grip // *Nature*. — 2004. — Vol. 431. — P. 756–756.
20. *Lee K.S., Park H.S., Park S.J.* et al. An antioxidant modulates expression of receptor activator of NF- $\kappa$ B in asthma // *Exp. Mol. Med.* — 2006. — Vol. 38. — P. 217–229.
21. *Lee K.S., Kim S.R., Park S.J.* et al. Antioxidant down-regulates IL-18 expression in asthma // *Mol. Pharmacol.* — 2006. — Vol. 70. — P. 1184–1193.
22. *Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C.* Nanomedicine: current status and future prospects // *FASEB J.* — 2005. — Vol. 19. — P. 311–330.
23. *Nadeem A., Chhabra S.K., Masood A.* et al. Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2003. — Vol. 111, №1. — P. 72–78.
24. *Oberdorster E., Zhu S., Blickey M.* et al. Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C<sub>60</sub>) on aquatic organisms // *Carbon*. — 2006. — Vol. 44, №6ю — P. 1112–1120.
25. *Ried M.A., Nel A.E.* Importance of oxidative stress in the pathogenesis and treatment of asthma // *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* — 2008. — Vol. 8. — P. 49–56.
26. *Ryan J., Bateman H., Stover A.* et al. Fullerene nanomaterials Inhibit the allergic response // *J. Immunol.* — 2007. — Vol. 179. — P. 665–672.
27. *Salgado J., Casadevall G., Puignero V.* et al. Characterization of allergoids from ovalbumin in vitro and in vivo // *Immunobiology*. — 1996. — Vol. 196, №4. — P. 375–386.
28. *Satoh M., Takayanagi I.* Pharmacological studies on fullerene (C<sub>60</sub>), a novel carbon allotrope, and its derivatives // *J. Pharmacol. Sci.* — 2006. — Vol. 100. — P. 513–518.
29. *Shen H.H., Ochkur S.I., McGarry M.P.* et al. A causative relationship exists between eosinophils and the development of allergic pulmonary pathologies in the mouse // *J. Immunology*. — 2003. — Vol. 170, №6. — P. 3296–3305.
30. *Shirinkin S.V., Churnosov M.I., Andrievsky G.V.* et al. Prospects for the use of fullerenes as antioxidants in pathogenetic therapy of bronchial asthma // *Clinical Medicine*. — 2009. — №5. — P. 35–39.
31. *Sugiura H., Ichinose M.* Oxidative and nitrate stress in bronchial asthma // *Antioxid. Redox Signal.* — 2008. — Vol. 10, №4. — P. 785–797.
32. *Tykhomyrov A.O., Nedzvetsky V.S., Klochkov V.K.* et al. Nanostructures of hydrated C<sub>60</sub> fullerene (C<sub>60</sub>hyen) protect rat brain against alcohol impact and attenuate behavioral impairments of alcoholized animals // *Toxicology*. — 2008. — Vol. 246, №2–3. — P. 158–165.
33. *Ulbrich W.A., Lamprecht A.* Targeted drug-delivery approaches by nanoparticulate carriers in the therapy of inflammatory diseases // *J. R. Soc. Interface*. — 2010. — №7. — P. 55–66.
34. *Wurtzen P.A., Lund L., Lund G.* et al. Chemical modification of birch allergen extract leads to a reduction in allergenicity as well as immunogenicity // *Int. Arch. Allergy Immunol.* — 2007. — Vol. 144. — P. 287–295.

Поступила 02.02.11

#### Сведения об авторах:

*Микитюк Марина Владимировна*, науч. сотр. НИИ ГИОРПФ ВГУЗУ «УМСА»

*Куценко Лариса Александровна*, канд. сел.-хоз. наук, ст. науч. сотр. НИИ ГИОРПФ ВГУЗУ «УМСА»

*Кайдашев Игорь Петрович*, д-р мед. наук, проф., зав. каф. внутренних болезней, проректор по науке ВГУЗУ «УМСА»

© М.М. Иванова, М.А. Сазонова, 2012  
УДК: 575.133

М.М. Иванова<sup>1,2</sup>, Е.Н. Бородачев<sup>2</sup>, М.А. Сазонова<sup>1,2,3</sup>

## Заболевания человека, ассоциированные с мутациями митохондриального генома

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

<sup>2</sup> Инновационный центр Сколково Научно-исследовательский институт атеросклероза, 143025, Москва, Инновационный Центр Сколково, ул. Новая, д.100

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а.2

*В обзоре дана характеристика различных митохондриальных цитопатий. Для каждого из заболеваний приведены ассоциированные с ним мутации митохондриального генома. Данная статья может быть полезна для врачей при поиске причин имеющей место симптоматики пациента, а также для медицинских генетиков, планирующих проводить исследования в данной области.*

**Ключевые слова:** митохондриальных цитопатий, мутации митохондриального генома

М.М. Ivanova<sup>1,2</sup>, E.N. Borodachev<sup>2</sup>, M.A. Sazonova<sup>1,2,3</sup>

## Human pathologies associated with mutations of mitochondrial genome

<sup>1</sup> The Institute for General Pathology and Pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

<sup>2</sup> Skolkovo Innovations Centre, Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Center, 143025, 100 Novaya Str., Moscow, Russia

<sup>3</sup> Russian Cardiology Research Center, 15a, 3<sup>rd</sup> Cherepkovskaya str., Moscow, 121552, Russia

*In this review different mitochondrial cytopathies were characterized. For each cytopathy we named mutations associated with this type of human pathology. This article may be useful for practicing doctors who are trying to find the cause of the patient's disease and for medical geneticists that are going to provide research in area of mitochondrial cytopathies.*

**Key words:** mutation, mitochondria, pathology, cytopathy, genome

Митохондрии являются автономными органеллами — каждая из них несёт в матриксе собственный геном, представленный кольцевой молекулой ДНК бактериального типа. Митохондриальная ДНК человека представляет собой кольцевую двухцепочечную молекулу, состоящую приблизительно из 16 500 пар нуклеотидов. Она содержит 37 генов: 22 гена транспортных РНК, 2 гена рибосомальных РНК и 13 субъединиц комплексов дыхательной цепи: цитохрома b, АТФазы, цитохром-С-оксидазы, NADH-дегидрогеназы [1]. Как правило, в каждой клетке содержится несколько десятков или сотен митохондрий, а в каждой митохондрии — несколько копий ее генома. Наследование митохондриального генома происходит по материнской линии, так как всю цитоплазму с содержащимися в ней митохондриями потомки получают вместе с яйцеклеткой, в то время как в сперматозоидах цитоплазма практически отсутствует.

**Для корреспонденции:** Иванова Мария Михайловна, аспирант, мл. науч. сотр. лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: masha\_i@inbox.ru

В идеальных условиях все митохондрии в клетке имеют одинаковые копии ДНК, такое состояние имеет название гомоплазмия. Но митохондриальный геном отличается нестабильностью, вероятно, из-за происходящего в митохондриях процесса тканевого дыхания, в связи с чем в нем нередки соматические мутации, возникающие в течение жизни индивида. Кроме того, ряд мутаций митохондриального генома, сформировавшись в организме матери, может передаваться ребёнку по наследству и далее умножаться путём деления органелл, содержащих мутантную ДНК. Вследствие параллельного существования мутантной и нормальной форм митохондриальной ДНК возникает явление гетероплазмии. Митохондриальные мутации могут проявляться в различной степени у несущего их индивида в зависимости от многих факторов, но главным образом — от локализации мутации и уровня гетероплазмии [51]. Эти специфические характеристики митохондриальной ДНК позволяют мутациям накапливаться в течение жизни, формируя фенотип носителя.

В литературе показана ассоциация различных заболеваний с некоторыми мутациями митохондриаль-

ного генома. Митохондриальные болезни или цитопатии — группа системных расстройств, которые поражают в основном мышечную и нервную ткани, так как основная функция митохондрий — продукция энергии, а клетки вышеупомянутых тканей нуждаются в ней в наибольшей степени. Дефектов процесса окислительного фосфорилирования к настоящему времени описано много, они могут быть связаны с одним или несколькими белковыми комплексами, информация о которых содержится в митохондриальном геноме. В одной клетке, как было сказано ранее, могут сосуществовать митохондрии нормальные и с нарушенной функцией. За счет первых клетка может функционировать довольно долгое время. Если же часть митохондрий, несущих нормальный геном, по каким-то причинам элиминируется и продукция энергии в клетке падает ниже определенного порога, происходит компенсаторная пролиферация всех митохондрий, включая дефектные, что крайне негативно сказывается на процессе жизнедеятельности всего организма. По этой причине человек, несущий мутацию в одной из копий митохондриального генома, может вообще не иметь клинических проявлений заболевания. На практике это проявляется довольно длительным бессимптомным периодом при многих цитопатиях. Однако наступает момент, когда дефектные формы митохондриальной ДНК накапливаются, и патологические признаки постепенно начинают проявляться. Манифестация заболевания наблюдается у больных в различном возрасте, но чем раньше поставлен диагноз, тем менее благоприятен прогноз для данного пациента.

### Характерные признаки митохондриальных цитопатий

Характерные признаки цитопатий приведены в табл. 1.

Материал, необходимый для забора у пациента при изучении митохондриальных мутаций, — кровь, а также ткань поражённых заболеванием органов.

### Синдромы митохондриальных цитопатий

Некоторые группы наиболее часто встречающихся комбинаций симптомов митохондриальных цитопатий объединены в синдромы, все они являются сокращениями английских названий симптомов.

*MELAS — Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes — митохондриальная миопатия, энцефалопатия, лактатный ацидоз и инсультоподобные эпизоды.*

*MELAS* — нейродегенеративное заболевание, обычно диагностируется в возрасте от 5 до 35 лет инсультоподобными состояниями или мигренью (чаще всего 5—15 лет). При развитии заболевания постепенно гибнут нейроны головного мозга, демиелинизируются нервные волокна. Инсультоподобные состояния возникают по причине митохондриальной ангиопатии (следствие гиперпролиферации митохондрий) и не соответствуют локализации магистральных сосудов мозга. Часто наблюдаются нейросенсорные расстройства слуха. Мутации, ассоциированные с *MELAS*, представлены в табл. 2.

*CPEO/PEO — External Ophthalmoplegia, Ophthalmoplegia plus syndrome — офтальмоплегия, связанная с поражением глазодвигательных мышц.*

Манифестация заболевания происходит в детском возрасте. Причинами обращения в медицинское учреждение, как правило, являются повышенная утомляемость, мышечная слабость, птоз и отставание роста. Три основных симптома, по которым ставится диагноз:

- 1) манифестация до 20 лет;
- 2) прогрессирующая наружная офтальмоплегия;
- 3) пигментная ретинопатия.

Дополнительными симптомами, встречающимися при данном заболевании являются высокое содержание белка в церебро-спинальной жидкости, блокада сердечной проводимости, атаксия. Мутации, ассоциированные с *CPEO/PEO*, представлены в табл. 3.

Таблица 1

Признаки митохондриальных цитопатий

Орган / система органов	Проявление цитопатий
Скелетные мышцы	Низкая толерантность к физической нагрузке, гипотония, проксимальная миопатия, включающая фасциальные и фарингеальные мышцы, офтальмопарез, птоз
Сердце	Нарушения сердечного ритма, гипертрофическая миокардиопатия
Центральная и периферическая нервная система	Атрофия зрительного нерва, пигментная ретинопатия, миоклонус, деменция, инсультоподобные эпизоды, расстройства психики
Эндокринная система	Диабет, гипопаратиреозидизм, нарушение экзокринной функции поджелудочной железы, низкий рост

*MIDD* — *Maternally Inherited Diabetes and Deafness* — наследуемые по материнской линии диабет и глухота.

В отличие от вышеупомянутого синдрома *MELAS* не сопровождается неврологической симптоматикой. Мутации, ассоциированные с *MIDD*, представлены в табл. 4.

*MERRF* — *Myoclonic Epilepsy associated with Ragged Red Fibres* — миоклоническая эпилепсия с обнаруженными *RRF* — мышечные волокна с измененными митохондриями — так называемые *ragged-red* волокна.

Манифестация заболевания происходит по утомляемости при физической нагрузке, болях в икроножных мышцах, снижения внимания. Далее эти симптомы развиваются в миоклонус-эпилепсию, атаксию и деменцию. Мутации, ассоциированные с *MERRF*, представлены в табл. 5.

*NIDDM* — *Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus* — проявления инсулин-независимого сахарного диабета.

Сахарный диабет характеризуется повышением уровня глюкозы в крови, снижением утилизации глюкозы и повышением мобилизации аминокислот и жирных кислот. У пациента наблюдаются усиление жажды, частое обильное мочеотделение, слабость, сухость во рту, миоклонус. Мутации, ассоциированные с *NIDDM*, представлены в табл. 6.

*LHON* — *Leber Hereditary Optic Neuropathy* — врожденная нейропатия глазного нерва

Для заболевания характерна безболезненная потеря зрения, вызванная атрофией зрительного нерва. Возраст манифестации *LHON* — от 8 до 60 лет, как правило — в 20—30 лет. Как правило, дегенерация

Таблица 2

Мутации, ассоциированные с *MELAS*

Ген	Мутация	Позиция	Ссылка на публикацию
tRNA-Leu (кодон узнавания UUR)	A3243G	Нуклеотид 14, входит в область терминации транскрипции петли DHU	[50]
	C3256T	Нуклеотид 25, входит в область терминации транскрипции стебелька петли DHU	[20, 59]
	T3271C	Нуклеотид 40, входит в состав стебелька петли антикодона	[43]
ND5, комплекс I	G13042A	Аминокислота 236: замена аланина на треонин	[33]
Цитохром В, комплекс 3	A15533G	Аминокислота 263: замена аспарагина на аспарагиновую кислоту	[11]

Таблица 3

Мутации, ассоциированные с *CPEO/PEO*

Ген	Мутация	Позиция	Ссылка на публикацию
tRNA-Val	T1658C	Нуклеотид 61, входит в состав стебелька Т-петли	[53]
tRNA-Gly	T9997C	Нуклеотид 7, входит в состав стебелька акцептора	[48]

Таблица 4

Мутации, ассоциированные с *MIDD*

Ген	Мутация	Позиция	Ссылка на публикацию
Делеция позиций митохондриального генома с 4308 по 14874			
tRNA-Leu (кодон узнавания UUR)	A3243G	Нуклеотид 14, входит в область терминации транскрипции петли DHU	[22, 38]
ND1, комплекс I	A3421G	Аминокислота 39: замена валина на изолейцин	[6]

Таблица 5

Мутации, ассоциированные с *MERRF*

Ген	Мутация	Позиция	Ссылка на публикацию
tRNA-Lys	A8344G	Нуклеотид 55, входит в состав Т-петли	[8, 50]
	T8356C	Нуклеотид 65, входит в состав стебелька Т-петли	[8]
	G8363A	Нуклеотид 72, входит в состав стебелька акцептора	[40]
ND5, комплекс I	G13042A	Аминокислота 236: замена аланина на треонин	[33]

одного из нервов опережает патологические изменения во втором. Мутации, ассоциированные с *LHON*, представлены в табл. 7.

*Аминогликозид-индуцированные расстройства слуха.*

После приёма антибиотиков группы аминогликозидов может наблюдаться нарушение слуха. У пациентов, проявивших такую неблагоприятную реакцию на аминогликозидсодержащие препараты, детектируется ряд мутаций митохондриального генома.

Мутации, ассоциированные с аминогликозид-индуцированными расстройствами слуха, представлены в табл. 8.

*NAPR — Neuropathy, Ataxia and Pigmentary Retinopathy — нейропатия, атаксия и пигментная ретинопатия.*

Первичная манифестация до 20 лет, чаще всего в младенческом возрасте. Кроме симптомов, вошедшей в название синдрома, у больных могут встречаться деменция, судороги, тугоухость.

Мутации, ассоциированные с *NAPR*, представлены в табл. 9.

*KSS — Kearns-Sayre Syndrome — ретинопатия, слабость проксимальных мышц, аритмия и атаксия.*

Начало заболевания, как правило, характеризуется отставанием роста, повышенной утомляемостью,

Таблица 6

Мутации, ассоциированные с *NIDDM*

Ген	Мутация	Позиция	Ссылка на публикацию
16S rRNA	T3200C	Нуклеотид 1529	[54]
tRNA-Leu (кодон узнавания UUR)	G3242A	Нуклеотид 13, входит в область терминации транскрипции петли DHU	[10]
	A3252C	Нуклеотид 23, входит в область терминации транскрипции петли DHU	[26, 32]
	T3264C	Нуклеотид 33, входит в состав петли антикодона	[45]
ND1, комплекс I	G3316A	Аминокислота 4: замена аланина на треонин	[34]
	T3336C	Аминокислота 10: изолейцин, не изменяется	[31, 57]
	T3394C	Аминокислота 30: замена тирозина на гистидин	[16]
ND6, комплекс I	T14577C	Обратное направление синтеза, аминокислота 33: замена изолейцина на валин	[46]
ND2, комплекс I	A4833G	Аминокислота 122: замена аланина на треонин	[23]

Таблица 7

Мутации, ассоциированные с *LHON*

Ген	Мутация	Позиция	Ссылка на публикацию
ND1, комплекс I	G3460A	Аминокислота 52: замена аланина на треонин	[17, 18, 21, 28, 37, 41, 56]
CO3, комплекс 4	G9804A	Аминокислота 200: замена аланина на треонин	[41]
ND4, комплекс I	G11778A	Аминокислота 340: замена аргинина на гистидин	[9, 17, 21, 27, 30, 35, 37, 39, 41, 49, 56]
ND6, комплекс I	G14459A	Обратное направление синтеза — Аминокислота 72: замена аланина на валин	[14, 43]
	A14484G	Обратное направление синтеза — Аминокислота 64: замена метионина на валин	[2, 17, 21, 27, 41, 56]
Цитохром В комплекс 3	G15257A	Аминокислота 171: замена аспарагиновой кислоты на аспарагин	[17, 41]

Таблица 8

Мутации, ассоциированные с аминогликозид-индуцированными расстройствами слуха

Ген	Мутация	Позиция	Ссылка на публикацию
12S rRNA	T1095C	Нуклеотид 448	[25]
	C1494T	Нуклеотид 847	[55]
	A1555G	Нуклеотид 908	[12, 15, 24, 58]
	961insC	Нуклеотид 314, дупликация C	[24]

мышечной слабостью. Главными для постановки диагноза являются 3 симптома:

- 1) ранняя манифестация — до 20 лет;
- 2) прогрессирующий паралич глазодвигательных мышц;
- 3) пигментная дегенерация сетчатки с постепенной потерей зрения.

Дополнительными могут быть симптомы: высокое содержание белка в церебро-спинальной жидкости, атаксия, блокада сердечной проводимости.

Мутации, ассоциированные с KSS, представлены в табл. 10.

#### *Кардиомиопатия, энцефаломиопатия.*

Для данного типа заболеваний наиболее характерна дилатационная кардиомиопатия — нарушение сократительной функции миокарда с выраженным расширением камер сердца. Симптомами являются нара-

стающая сердечная недостаточность и размер полости левого желудочка в диастолу более 6 см на УЗИ.

Энцефаломиопатия, ассоциированная с митохондриальными мутациями, проявляется в раннем возрасте. Это заболевание центральной нервной системы характеризуется поражением серого вещества головного и спинного мозга.

Мутации, ассоциированные с кардиомиопатией и энцефаломиопатией, представлены в табл. 11.

### **Заключение**

В момент поступления пациента в медицинское учреждения наиболее важным является понимание этиологии имеющей место клинической картины. В случае явных признаков наследственных цитопатий нужно проводить анализ генома митохондрий пациента на наличие и степень выраженности ряда мутаций,

Таблица 9

Мутации, ассоциированные с NAPP

Ген	Мутация	Позиция	Ссылка на публикацию
АТФ-синтаза, комплекс5	T8993GC	Аминокислота 156: замена лейцина на аргинин или пролин	[50]
tRNA-Leu (кодон узнавания CUN)	G12315A	Нуклеотид 52, входит в состав стебелька Т-петли	[52]

Таблица 10

Мутации, ассоциированные с KSS

Мутация	Ссылка на публикацию
Дупликация нуклеотидов (CCCCCTCCCC-тандемные повторы в позициях 305—314 и 956—965, позволяющие удвоить участок в 652 осн.)	[29]

Таблица 11

Мутации, ассоциированные с кардиомиопатией и энцефаломиопатией

Ген	Мутация	Позиция	Ссылка на публикацию
12S rRNA	G1541A	Нуклеотид 894	[19]
tRNA-Val	C1634T	Нуклеотид 35, входит в состав антикодона	[19]
tRNA-Leu (кодон узнавания UUR)	A3260G	Нуклеотид 29, входит в состав стебелька петли антикодона	[48]
tRNA-Ile	A4269G	Нуклеотид 7, входит в состав стебелька акцептора	[48]
CO2, комплекс4	T 7587C	Аминокислота I: замена метионина на треонин	[7]
tRNA-Lys	A8296G	Нуклеотид 2, входит в состав стебелька акцептора	[5]
	A8348G	Нуклеотид 59, входит в состав Т-петли	[47]
	G8363A	Нуклеотид 72, входит в состав стебелька акцептора	[5, 40]
CO3, комплекс4	T9957C	Аминокислота 251: замена фенилаланина на лейцин	[3]
tRNA-Gly	T9997C	Нуклеотид 7, входит в состав стебелька акцептора	[48]
tRNA-His	G12192A	Нуклеотид 59, входит в состав Т-петли	[42]
tRNA-Leu (кодон узнавания CUN)	T12297C	Нуклеотид 33, входит в состав петли антикодона	[13]
ND6, комплекс1	A14484G	Обратное направление синтеза — Аминокислота 64: замена метионина на валин	[17, 21, 27, 25, 41, 56]
Цитохром В, комплекс3	G15059A	Аминокислота105: замена глицина на аргинин	[25]

для которых, по данным литературы, была описана ассоциация с предварительно диагностированным заболеванием. В последнее время распространена теория, согласно которой, мутации митохондриального генома не являются дискретными причинами цитопатий, важное значение в развитии заболевания имеет скорее общий мутантный фон, сформированный всеми мутантными аллелями [36, 44]. Симптомы возникают после достижения порога суммарной мутационной нагрузки организма.

Информация о мажорных мутантных гаплотипах, вызывающих конкретную патологию, может быть полезна как для медиков при постановке диагноза пациенту, так и для научных работников, планирующих исследования в данной области молекулярной генетики. По данной тематике уже существует ряд литературных обзоров, но в виду длительного времени, прошедшего с момента их публикации, настоящая работа видится необходимым дополнением к уже содержащейся в предыдущих обзорах информации.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

### Список литературы

1. *Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J., Staden R., Young I.G.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome // *Nature*. — 1981. — Vol. 290, №5806. — P. 457–465.
2. *Andreu A.L., Hanna M.G., Reichmann H., Bruno C., Penn A.S., Tanji K., Pallotti F., Iwata S., Bonilla E., Lach B., Morgan-Hughes J., DiMauro S.* Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA // *N. Engl. J. Med.* — 1999. — Vol. 341, №14. — P. 1037–1044.
3. *Arbustini E., Fasani R., Morbini P., Diegoli M., Grasso M., Dal Bello B., Marangoni E., Banfi P., Banchieri N., Bellini O., Comi G., Narula J., Campana C., Gavazzi A., Danesino C., Vigano M.* Coexistence of mitochondrial DNA and beta myosin heavy chain mutations in hypertrophic cardiomyopathy with late congestive heart failure // *Heart*. — 1998. — Vol. 80, №6. — P. 548–558.
4. *Ballinger S.W., Shoffner J.M., Hedaya E.V., Troncone I., Polak M.A., Koontz D.A., Wallace D.C.* Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion // *Nat. Genet.* — 1992. — Vol. 1(1). — P. 11–15.
5. *Bornstein B., Mas J.A., Patrono C., Fernandez-Moreno M.A., Gonzalez-Vioque E., Campos Y., Carrozzo R., Martin M.A., del Hoyo P., Santorelli F.M., Arenas J., Garesse R.* Comparative analysis of the pathogenic mechanisms associated with the G8363A and A8296G mutations in the mitochondrial tRNA(Lys) gene // *Biochem. J.* — 2005. — Vol. 387, №3. — P. 773–778.
6. *Chen F.L., Liu Y., Song X.Y., Hu H.Y., Xu H.B., Zhang X.M., Shi J.H., Hu J., Shen Y., Lu B., Wang X.C., Hu R.M.* A novel mitochondrial DNA missense mutation at G3421A in a family with maternally inherited diabetes and deafness // *Mutat. Res.* — 2006. — Vol. 602, №1–2. — P. 26–33.
7. *Clark K.M., Taylor R.W., Johnson M.A., Chinney P.F., Chrzanowska-Lightowers Z.M., Andrews R.M., Nelson I.P., Wood N.W., Lamont P.J., Hanna M.G., Lightowers R.N., Turnbull D.M.* An mtDNA mutation in the initiation codon of the cytochrome C oxidase subunit II gene results in lower levels of the protein and a mitochondrial encephalomyopathy // *Am. J. Hum. Genet.* — 1999. — Vol. 64, №5. — P. 1330–1339.
8. *DiMauro S., Hirano M., Kaufmann P., Tanji K., Sano M., Shungu D.C., Bonilla E., DeVivo D.C.* Clinical features and genetics of myoclonic epilepsy with ragged red fibers // *Adv. Neurol.* — 2002. — №89. — P. 217–229.
9. *Feng X., Pu W., Gao D.* Diagnostic and differential diagnostic potential of mitochondrial DNA assessment in patients with Leber's hereditary optic neuropathy // *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. — 2001. — Vol. 37, №3. — P. 174–177.
10. *Gattermann N., Wulfert M., Junge B., Germing U., Haas R., Hofhaus G.* Ineffective hematopoiesis linked with a mitochondrial tRNA mutation (G3242A) in a patient with myelodysplastic syndrome // *Blood*. — 2004. — Vol. 103(4). — P. 1499–1502.
11. *Gil Borlado M.C., Moreno Lastres D., Gonzalez Hoyuela M., Moran M., Blazquez A., Pello R., Marin Bueira L., Gabaldon T., Garcia Penas J.J., Martin M.A., Arenas J., Ugalde C.* Impact of the mitochondrial genetic background in complex III deficiency // *PLoS One*. — 2010. — Vol. 5, №9.
12. *Giordano C., Pallotti F., Walker W.F., Checcarelli N., Musumeci O., Santorelli F., d'Amati G., Schon E.A., DiMauro S., Hirano M., Davidson M.M.* Pathogenesis of the deafness-associated A1555G mitochondrial DNA mutation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2002. — Vol. 293(1). — P. 521–529.
13. *Grasso M., Diegoli M., Brega A., Campana C., Tavazzi L., Arbustini E.* The mitochondrial DNA mutation T12297C affects a highly conserved nucleotide of tRNA(Leu(CUN)) and is associated with dilated cardiomyopathy // *Eur. J. Hum. Genet.* — 2001. — Vol. 9, №4. — P. 311–315.
14. *Gropman A., Chen T.J., Perng C.L., Krasnewich D., Chernoff E., Tiffi C., Wong L.J.* Variable clinical manifestation of homoplasmic G14459A mitochondrial DNA mutation // *Am. J. Med. Genet. A*. — 2004. — Vol. 124A, №4. — P. 377–382.
15. *Guan M.X., Fischel-Ghodsian N., Attardi G.* Molecular pathogenetic mechanism of maternally inherited deafness // *Hum. Mol. Genet.* — 1996. — Vol. 5(7). — P. 963–971.
16. *Hirai M., Suzuki S., Onoda M., Hinokio Y., Ai L., Hirai A., Ohtomo M., Komatsu K., Kasuga S., Satoh Y., Akai H., Toyota T.* Mitochondrial DNA 3394 mutation in the NADH dehydrogenase subunit 1 associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1996. — Vol. 219, №3. — P. 951–955.
17. *Huoponen K.* Leber hereditary optic neuropathy: clinical and molecular genetic findings // *Neurogenetics*. — 2001. — Vol. 3, №3. — P. 119–125.
18. *Hwang J.M., Chang B.L., Koh H.J., Kim J.Y., Park S.S.* Leber's hereditary optic neuropathy with 3460 mitochondrial DNA mutation // *J. Korean Med. Sci.* — 2002. — Vol. 17, №2. — P. 283–286.
19. *Jaksch M., Ogilvie I., Yao J., Kortenhaus G., Bresser H.G., Gerbitz K.D., Shoubridge E.A.* Mutations in SCO2 are associated with a distinct form of hypertrophic cardiomyopathy and cytochrome c oxidase deficiency // *Hum. Mol. Genet.* — 2000. — Vol. 9(5). — P. 795–801.
20. *Jeppesen T.D., Schwartz M., Hansen K., Danielson E.R., Wibrand F., Vissing J.* Late onset of stroke-like epi-



sode associated with a 3256C→T point mutation of mitochondrial DNA // *J. Neurol. Sci.* — 2003. — Vol. 214, №1–2. — P. 17–20.

21. **Kermode A.G., Moseley I.F., Kendall B.E., Miller D.H., MacManus D.G., McDonald W.I.** Magnetic resonance imaging in Leber's optic neuropathy // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* — 1989. — Vol. 52, №5. — P. 671–674.

22. **Kobayashi Z., Tsunemi T., Miake H., Tanaka S., Watabiki S., Morokuma Y.** A mother and a child with maternally inherited diabetes and deafness (MIDD) showing atrophy of the cerebrum, cerebellum and brainstem on magnetic resonance imaging (MRI) // *Intern. Med.* — 2005. — Vol. 44, №4. — P. 328–331.

23. **Kong Q.P., Bandelt H.J., Sun C., Yao Y.G., Salas A., Achilli A., Wang C.Y., Zhong L., Zhu C.L., Wu S.F., Torroni A., Zhang Y.P.** Updating the East Asian mtDNA phylogeny: a prerequisite for the identification of pathogenic mutations // *Hum. Mol. Genet.* — 2006. — Vol. 15, №13. — P. 2076–2086.

24. **Li R., Xing G., Yan M., Cao X., Liu X.Z., Bu X., Guan M.X.** Cosegregation of C-insertion at position 961 with the A1555G mutation of the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family with maternally inherited hearing loss // *Am. J. Med. Genet. A.* — 2004. — Vol. 124A(2). — P. 113–117.

25. **Li Z., Li R., Chen J., Liao Z., Zhu Y., Qian Y., Xi-ong S., Heman-Ackah S., Wu J., Choo D.I., Guan M.X.** Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene in Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss // *Hum. Genet.* — 2005. — Vol. 117(1). — P. 9–15.

26. **Ma L., Wang H., Chen J., Jin W., Liu L., Ban B., Shen J., Hua Z., Chai J.** Mitochondrial gene variation in type 2 diabetes mellitus: detection of a novel mutation associated with maternally inherited diabetes in a Chinese family // *Chin. Med. J. (Engl.)*. — 2000. — Vol. 113, №2. — P. 111–116.

27. **Mackey D.A., Oostra R.J., Rosenberg T., Nikoskelainen E., Bronte-Stewart J., Poulton J., Harding A.E., Govan G., Bolhuis P.A., Norby S.** Primary pathogenic mtDNA mutations in multigeneration pedigrees with Leber hereditary optic neuropathy // *Am. J. Hum. Genet.* — 1996. — Vol. 59, №2. — P. 481–485.

28. **Man P.Y., Griffiths P.G., Brown D.T., Howell N., Turnbull D.M., Chinnery P.F.** The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England // *Am. J. Hum. Genet.* — 2003. — Vol. 72, №2. — P. 333–339.

29. **Mancuso M., Vives-Bauza C., Filosto M., Marti R., Solano A., Montoya J., Gamez J., DiMauro S., Andreu A.L.** A mitochondrial DNA duplication as a marker of skeletal muscle specific mutations in the mitochondrial genome // *J. Med. Genet.* — 2004. — Vol. 41(6). — e73.

30. **Mashima Y., Kigasawa K., Hasegawa H., Tani M., Oguchi Y.** High incidence of pre-excitation syndrome in Japanese families with Leber's hereditary optic neuropathy // *Clin. Genet.* — 1996. — Vol. 50, №6. — P. 535–537.

31. **Matsunaga H., Tanaka Y., Tanaka M., Gong J.S., Zhang J., Nomiya T., Ogawa O., Ogihara T., Yamada Y., Yagi K., Kawamori R.** Antiatherogenic mitochondrial genotype in patients with type 2 diabetes // *Diabetes Care.* — 2001. — Vol. 24, №3. — P. 500–503.

32. **Morten K.J., Cooper J.M., Brown G.K., Lake B.D., Pike D., Poulton J.** A new point mutation associated with mitochondrial encephalomyopathy // *Hum. Mol. Genet.* — 1993. — Vol. 2, №12. — P. 2081–2087.

33. **Naini A.B., Lu J., Kaufmann P., Bernstein R.A., Mancuso M., Bonilla E., Hirano M., DiMauro S.** Novel mitochondrial DNA ND5 mutation in a patient with clinical fe-

atures of MELAS and MERRF // *Arch. Neurol.* — 2005. — Vol. 62, №3. — P. 473–476.

34. **Nakagawa Y., Ikegami H., Yamato E., Takekawa K., Fujisawa T., Hamada Y., Ueda H., Uchigata Y., Miki T., Kumahara Y.** A new mitochondrial DNA mutation associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1995. — Vol. 209, №2. — P. 664–668.

35. **Nikoskelainen E., Wanne O., Dahl M.** Pre-excitation syndrome and Leber's hereditary optic neuroretinopathy // *Lancet.* — 1985. — Vol. 1, №8430. — P. 696.

36. **Nomiya T., Tanaka Y., Piao L., Hattori N., Uchino H., Watada H., Kawamori R., Ohta S.** Accumulation of somatic mutation in mitochondrial DNA and atherosclerosis in diabetic patients // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2004. — Vol. 1011. — P. 193–204.

37. **Puomila A., Viitanen T., Savontaus M.L., Nikoskelainen E., Huoponen K.** Segregation of the ND4/11778 and the ND1/3460 mutations in four heteroplasmic LHON families // *J. Neurol. Sci.* — 2002. — Vol. 205, №1. — P. 41–45.

38. **Reardon W., Ross R.J., Sweeney M.G., Luxon L.M., Pembrey M.E., Harding A.E., Trembath R.C.** Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA // *Lancet.* — 1992. — Vol. 340, №8832. — P. 1376–1379.

39. **Riordan-Eva P., Sanders M.D., Govan G.G., Sweeney M.G., Da Costa J., Harding A.E.** The clinical features of Leber's hereditary optic neuropathy defined by the presence of a pathogenic mitochondrial DNA mutation // *Brain.* — 1995. — Vol. 118 (Pt 2). — P. 319–337.

40. **Santorelli F.M., Mak S.C., El-Schahawi M., Casali C., Shanske S., Baram T.Z., Madrid R.E., DiMauro S.** Maternally inherited cardiomyopathy and hearing loss associated with a novel mutation in the mitochondrial tRNA(Lys) gene (G8363A) // *Am. J. Hum. Genet.* — 1996. — Vol. 58, №5. — P. 933–939.

41. **Schollen E., Vandenberk P., Cassiman J.J., Matthijs G.** Development of reverse dot-blot system for screening of mitochondrial DNA mutations associated with Leber hereditary optic atrophy // *Clin. Chem.* — 1997. — Vol. 43, №1. — P. 18–23.

42. **Shin W.S., Tanaka M., Suzuki J., Hemmi C., Toyooka T.** A novel homoplasmic mutation in mtDNA with a single evolutionary origin as a risk factor for cardiomyopathy // *Am. J. Hum. Genet.* — 2000. — Vol. 67(6). — P. 1617–1620.

43. **Stenqvist L., Paetau A., Valanne L., Suomalainen A., Pihko H.** A juvenile case of MELAS with T3271C mitochondrial DNA mutation // *Pediatr. Res.* — 2005. — Vol. 58, №2. — P. 258–262.

44. **Sternberg D., Danan C., Lombes A., Laforet P., Gi-rodon E., Goossens M., Amselem S.** Exhaustive scanning approach to screen all the mitochondrial tRNA genes for mutations and its application to the investigation of 35 independent patients with mitochondrial disorders // *Hum. Mol. Genet.* — 1998. — Vol. 7(1). — P. 33–42.

45. **Suzuki Y., Suzuki S., Hinokio Y., Chiba M., Atsumi Y., Hosokawa K., Shimada A., Asahina T., Matsuoka K.** Diabetes associated with a novel 3264 mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) mutation // *Diabetes Care.* — 1997. — Vol. 20, №7. — P. 1138–1140.

46. **Tawata M., Hayashi J.I., Isobe K., Ohkubo E., Ohtaka M., Chen J., Aida K., Onaya T.** A new mitochondrial DNA mutation at 14577 T/C is probably a major pathogenic mutation for maternally inherited type 2 diabetes // *Diabetes.* — 2000. — Vol. 49, №7. — P. 1269–1272.

47. **Terasaki F., Tanaka M., Kawamura K., Kanzaki Y., Okabe M., Hayashi T., Shimomura H., Ito T., Suwa M., Gong J.S., Zhang J., Kitaura Y.** A case of cardiomyopathy

showing progression from the hypertrophic to the dilated form: association of Mt8348A->G mutation in the mitochondrial tRNA(Lys) gene with severe ultrastructural alterations of mitochondria in cardiomyocytes // *Jpn. Circ. J.* — 2001. — Vol. 65, №7. — P. 691–694.

48. **Turner L.F., Kaddoura S., Harrington D., Cooper J.M., Poole-Wilson P.A., Schapira A.H.** Mitochondrial DNA in idiopathic cardiomyopathy // *Eur. Heart J.* — 1998. — Vol. 19, №11. — P. 1725–1729.

49. **Wallace DC, Brown MD, Lott MT.** Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease // *Gene.* — 1999. — Vol. 238(1). — P. 211–230.

50. **Wallace D.C., Singh G., Lott M.T., Hodge J.A., Schurr T.G., Lezza A.M., Elsas L.J. 2<sup>nd</sup>, Nikoskelainen E.K.** Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy // *Science.* — 1988. — Vol. 242(4884). — P. 1427–1430.

51. **Wong L.J., Senadheera D.** Direct detection of multiple point mutations in mitochondrial DNA // *Clin. Chem.* — 1997. — Vol. 43, №10. — P. 1857–1861.

52. **Yamagata K., Muro K., Usui J., Hagiwara M., Kai H., Arakawa Y., Shimizu Y., Tomida C., Hirayama K., Kobayashi M., Koyama A.** Mitochondrial DNA mutations in focal segmental glomerulosclerosis lesions // *J. Am. Soc. Nephrol.* — 2002. — Vol. 13, №7. — P. 1816–1823.

53. **Yan N., Cai S., Guo B., Mou Y., Zhu J., Chen J., Zhang T., Li R., Liu X.** A novel mitochondrial tRNA(Val) T1658C mutation identified in a CPEO family // *Mol. Vis.* — 2010. — Vol. 16. — P. 1736–1742.

54. **Yang T., Lam C.W., Tsang M.W., Tong S.F., Kam G.Y., Chan L.Y., Poon P.M., Wu X., Pang C.P.** Novel mitochondrial 16S rRNA mutation, 3200T->C, associated with adult-onset type 2 diabetes // *Chin. Med. J. (Engl.)*. — 2002. — Vol. 115(5). — P. 753–758.

55. **Zhao H., Li R., Wang Q., Yan Q., Deng J.H., Han D., Bai Y., Young W.Y., Guan M.X.** Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family // *Am. J. Hum. Genet.* — 2004. — Vol. 74(1). — P. 139–152.

56. **Руденская Г.Е., Захарова Е.Ю., Адарчева Л.С., Михайлова Е.Н., Карлова И.З.** Наследственная атрофия зрительных нервов Лебера: неврологические и другие внеглазные проявления // *Журнал неврологии и психиатрии.* — 2004. — Т. 2, №40.

57. **Желанкин А.В., Сазонова М.А., Коробов Г.А., Хасанова З.Б., Постнов А.Ю., Орехов А.Н., Собенин И.А.** Детекция замены тимина на цитозин в позиции 3336 митохондриального генома при атеросклеротических поражениях человека // *Современный мир, природа и человек.* — 2011. — Т. 2, №1. — С. 59–61.

58. **Сазонова М.А., Желанкин А.В., Иванова М.М., Митрофанов К.Ю., Постнов А.Ю., Орехов А.Н., Собенин И.А.** Анализ мутации митохондриального генома A1555G при атеросклерозе интимы аорты человека // *Современный мир, природа и человек.* — 2011, Т. 2, №1. — С. 67–69.

59. **Собенин И.А., Сазонова М.А., Мясоедова В.А., Кириченко Т.В., Иванова М.М., Постнов А.Ю., Орехов А.Н.** Полиморфизм 3256С/Т митохондриальной ДНК как маркер ишемической болезни сердца и атеросклероза // *Проблемы и перспективы современной науки.* — 2011. — Т. 3, №1. — С. 108–110.

Поступила 22.03.2012

#### Сведения об авторах:

Бородачев Евгений Николаевич, дипломник НИИ атеросклероза Сколково

Сазонова Маргарита Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН

А.В. Желанкин<sup>1,2</sup>, М.А. Сазонова<sup>1,3</sup>

## **Ассоциация мутаций митохондриального генома человека с хроническими заболеваниями невоспалительного генеза: сахарным диабетом 2-го типа, артериальной гипертонией и различными видами кардиомиопатии**

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

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт атеросклероза Российской Академии естественных наук, 121609, Москва, а/я №21

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а

*Генетическая предрасположенность имеет большое значение среди прочих факторов риска некоторых социально значимых хронических заболеваний невоспалительного генеза. При этом роль в развитии этих заболеваний могут играть изменения как в ядерном, так и в митохондриальном геноме человека. Исследования последних лет показали, что мутации митохондриального генома ассоциированы с такими заболеваниями, как сахарный диабет 2-го типа, артериальная гипертония, и различные виды кардиомиопатии. Материнское наследование в ряде случаев заболеваний позволяет предположить, что их причиной могут являться именно дефекты митохондриальной ДНК.*

**Ключевые слова:** митохондриальный геном, сахарный диабет 2-го типа, артериальная гипертония, кардиомиопатия

A.V. Zhelankin<sup>1,2</sup>, M.A. Sazonova<sup>1,3</sup>

## **Association of the mutations in the human mitochondrial genome with chronic non-inflammatory diseases: type 2 diabetes, hypertension and different types of cardiomyopathy**

<sup>1</sup> The Institute for General Pathology and Pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

<sup>2</sup> Institute for Atherosclerosis Research, Russian Academy of Natural Sciences, postbox 21, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Russian Cardiology Research Center, 15a, 3<sup>rd</sup> Cherepkovskaya str., Moscow, 121552, Russia

*Genetic predisposition is of great importance among other risk factors of certain socially significant chronic non-inflammatory diseases. Changes in both nuclear and mitochondrial human genome may play a role in the development of these diseases. Recent studies have shown that mutations in the mitochondrial genome are associated with some diseases, such as type 2 diabetes, hypertension, and various types of cardiomyopathy. Maternal inheritance in some cases suggests that their cause may be precisely the defects of mitochondrial DNA.*

**Key words:** mitochondrial genome, type 2 diabetes, hypertension, cardiomyopathy

Хронические заболевания невоспалительного генеза в XXI веке занимают лидирующие позиции в структуре заболеваемости и смертности населения России и развитых стран. Наиболее значимыми среди них являются такие заболевания, как артериальная гипертония, ишемическая болезнь сердца, нарушение мозгового кровообращения, сахарный диабет 2-го типа. Артериальная гипертония наносит огромный ущерб здоровью населения, будучи наиболее сильным

фактором риска заболеваемости и смертности от сердечно-сосудистых заболеваний. Наличие артериальной гипертонии влияет на смертность от ишемической болезни сердца и мозговых инсультов. По причине ишемической болезни сердца происходит наибольшее количество смертей в мире (около 13% от общей смертности населения, и до 28% в некоторых развитых странах). Летальные исходы вследствие инфарктов миокарда и инсультов составляют около 10% от общей смертности в мире. Сахарный диабет является одним из наиболее распространенных хронических заболеваний. Число лиц, страдающих сахарным диабетом, увеличивается из года в год, и, по данным

**Для корреспонденции:** Желанкин Андрей Викторович, младш. научн. сотр. лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: paleomania@yandex.ru

Международной диабетической федерации, в 2010 г. в достигло около 285 млн, что составляет 6,6% от общего населения планеты [3, 29].

Генетическая предрасположенность имеет большое значение среди прочих факторов риска данных заболеваний, при этом на развитие патологий могут влиять изменения как в ядерном, так и в митохондриальном геноме человека. Но если к настоящему моменту ассоциация ядерного генома с рассматриваемыми патологиями в достаточной степени изучена, то роль мутаций митохондриальной ДНК (мтДНК) в развитии этих заболеваний до сих пор раскрыта не полностью.

### Ассоциация мутаций митохондриального генома с заболеваниями человека

Митохондриальный геном отличается выраженной нестабильностью, и в течение жизни индивида в нем нередко возникают мутации. Это связано с прохождением в митохондриях процессов дыхания и, соответственно, с повышенным количеством активных форм кислорода. В настоящее время известно более 100 точечных мутаций и несколько сот структурных перестроек мтДНК, ассоциированных с характерными нейромышечными и другими митохондриальными синдромами — от летальных в неонатальном периоде жизни до заболеваний с поздним началом. Наиболее значимыми среди них являются: митохондриальные миопатии и энцефаломиопатии, обусловленные мутациями в генах транспортных РНК; наследственная оптическая нейропатия Лебера (LHON), синдром MELAS (митохондриальная миопатия, энцефалопатия, молочнокислый ацидоз, инсультоподобные состояния); синдром MERRF (микоклоническая эпилепсия в сочетании с «рваными красными» мышечными волокнами); синдром Барта, синдром Кирнса—Сейра. У лиц, страдающих различными типами кардиомиопатий, наследуемых по материнской линии, выявлены мутации в генах, кодирующих митохондриальные тРНК [5].

Однако список болезней, ассоциированных с изменениями в мтДНК, отнюдь не ограничивается этими «первичными» митохондриальными заболеваниями. Громадное количество болезней включает в себя нарушения клеточного энергообмена в качестве «вторичных» звеньев патогенеза.

### Митохондриальные мутации при хронических заболеваниях невоспалительного генеза

Исследования последних лет показывают, что мутации митохондриального генома ассоциированы с такими хроническими заболеваниями невоспалительного генеза, как сахарный диабет 2-го типа, артериальная гипертензия, и различные виды кардиомиопатии.

**Сахарный диабет 2-го типа** характеризуется нарушением взаимодействия инсулина с клетками тканей организма (инсулинорезистентность) как следствием изменения структуры или уменьшения количества специфических рецепторов для инсулина, изменения структуры самого инсулина или нарушения внутриклеточных механизмов передачи сигнала от рецепторов к органеллам клетки [1]. Сахарный диабет является мощным фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний. На сегодняшний день большинство смертей от сахарного диабета обусловлено сосудистой патологией, часто являющейся следствием диабета [10].

Один из предлагаемых генетических факторов сахарного диабета 2-го типа — это мутации митохондриального генома. Возможная причина связи митохондриальных мутаций с развитием этого заболевания заключается в том, что митохондрии играют важную роль в глюкозо-индуцированной секреции инсулина в  $\beta$ -клетки поджелудочной железы. Материнское наследование в ряде случаев сахарного диабета 2-го типа позволяет предположить, что именно дефекты мтДНК могут являться причиной заболевания. Известно, что tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) и смежная с ней область субъединицы 1 NADH-дегидрогеназы (ND1) в рамках митохондриального генома связаны с высоким риском сахарного диабета [33, 34].

Ниже приведены описания исследований ассоциации мутаций мтДНК с сахарным диабетом 2-го типа.

**Нуклеотидные замены 3316G→A, 3394T→C, 3426A→G (ND1).** Мутация 3316G→A меняет неполярный аланин на полярный треонин (GCC→AKK), 3394T→C преобразует тирозин в гистидин (TAT→CAT). 3426A→G — это мутация, находящаяся в триplete, кодирующем валин, наличие которой изменяет конфигурацию мтДНК. В результате изменяется конфигурация продукта гена ND1 — белковой субъединицы 1 NADH-дегидрогеназы, которая оказывает влияние на ферментативную активность дыхательного комплекса, что, в свою очередь, может привести к нарушению окислительного фосфорилирования в системе митохондрий. Это может уменьшить возможность секреции инсулина  $\beta$ -клетками поджелудочной железы, и внести вклад в патогенез сахарного диабета. Исследование показало значимые различия по частоте встречаемости этих трех мутаций между группой диабетиков и группой контрольных пациентов. В группе больных диабетом у лиц, несущих митохондриальные мутации гена ND1, чаще обнаруживалось семейное наследование диабета по материнской линии по сравнению с лицами, у которых эти мутации отсутствовали. Для одного из пациентов с мутацией 3426A→G была проанализирована родословная, и были найдены еще 12 членов семьи по материнской линии, несущих эту мутацию [34].

**3421A→G (ND1).** Мутация была обнаружена в семье с наследованием сахарного диабета 2-го типа по материнской линии, но не присутствовала ни у 1350 не связанных друг с другом больных, ни у 50 не страдающих диабетом людей. Было обнаружено, что у всех членов семьи с диабетом болезнь начиналась в период 35—42 лет, и сопровождалась глухотой различной степени [9].

**3243A→G (tRNA-Leu).** Замена А на G в позиции A3243G в tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> гена является наиболее часто встречающимся дефектом, связанным с сахарным диабетом. Эта мутация была впервые описана в связи с нервно-мышечным метаболическим синдромом MELAS, в которых диабет является общим признаком, а недавно была признана в качестве причины диабетического подтипа матерински унаследованного диабета и глухоты (MIDD) [21]. По другим данным, эта мутация является соматической и ее причиной является окислительный стресс. Поскольку диабет может привести к окислительному стрессу, можно предполагать, что накопление соматических мутаций A3243G в митохондриальной ДНК может быть ускорено диабетом [30].

**14577T→C (ND6).** Проведено исследование 69-летней женщины с сахарным диабетом типа 2 из семьи с 16-ю больными сахарным диабетом с типичным наследованием по материнской линии. У пробанда не обнаружено никаких серьезных делеций в митохондриальной ДНК. Также были проведены исследования на гибридных клетках: экзогенные митохондриальные ДНК, взятые у пробанда и контрольных пациентов, были перенесены в клетки HeLa (линия раковых клеток, используемых для научных исследований) с последующей их культивацией и клонированием. По сравнению с гибридными клетками контроля, в гибридных клетках пробанда были обнаружены 6 замен нуклеотидов. Среди них 14577T→C, со степенью гетероплазмии 98,9%, является новым миссенс-замещением в гене дегидрогеназы NADH 6. Мутация 14577T→C, вероятно, является основной патогенной мутацией для диабета типа 2 в этой семье [27].

**3200T→C (16S rRNA).** Для исследования были привлечены в общей сложности 277 больных сахарным диабетом 2-го типа и 241 здоровых лиц. Были исследованы четыре гомоплазмические нуклеотидные замены, 3200T→C, 3206C→T, 3290T→C и 3316G→A. Только мутация 3200T→C присутствовала у диабетиков и отсутствовала у здоровых людей. Между тремя другими вариантами мутаций и диабетом 2-го типа не было выявлено статистически значимых связей [33].

**8296A→G (tRNA-Lys).** Проведен анализ 1216 пациентов с сахарным диабетом, 44 пациентов с нейросенсорной глухотой и контрольная группа из

300 чел., не страдающих диабетом. Мутация была выявлена у 11 неродственных диабетиков (0,90%), одного больного с глухотой (2,3%) и отсутствовала в контрольной группе. Семь из этих 12 испытуемых унаследовали заболевание по материнской линии. Глухота была выявлена у 7 из 12 пробандов. В родословных четырех семей сахарный диабет наследовался по материнской линии на протяжении двух или трех поколений. Эта мутация может объяснить не более чем 1% причин сахарного диабета [13].

**3264T→C (tRNA-Leu).** Мутация обнаружена у пробанда, больного сахарным диабетом (0,5% мутантной ДНК в лейкоцитах и 30% в мышцах), но не обнаружена среди выборки из 201 здоровых людей. Гетероплазмия мутации, материнское наследование сахарного диабета и симптомы, связанные с митохондриальной дисфункцией говорят о патогенности данной мутации [26].

**Артериальная гипертензия** — это заболевание, характеризующееся стойким, хроническим повышением систолического (более 140 мм рт. ст.) и диастолического (более 90 мм рт. ст.) артериального давления. Артериальная гипертензия является одним из основных факторов смертности при сердечно-сосудистых заболеваниях. Причинами летального исхода артериальной гипертензии чаще всего являются ишемическая болезнь сердца с последующими инфарктом миокарда, хронической сердечной недостаточностью, инсультом, прогрессирующей почечной недостаточностью.

В развитии эссенциальной артериальной гипертензии одним из основных факторов является генетический. В настоящее время ученые исследуют генетические факторы, которые поражают ренин-ангиотензиновую систему, занимающую центральное место в регуляции солевого и жидкостного гомеостаза и поддержания сосудистого тонуса. Стимуляция или ингибирование этой системы, соответственно, повышает или понижает кровяное давление. В частности, исследования гена ангиотензиногена показали взаимосвязь его полиморфизмов M235T и T174M с развитием артериальной гипертензии [22].

У больных с семейными и спорадическими формами идиопатической легочной артериальной гипертензии (ИЛАГ) были обнаружены мутации гена *VMR2* (bone morphogenetic protein receptor, type 2). По-видимому, при мутации этого гена или выходе его из строя сосудистые клетки в малой легочной артерии могут нерегулируемо расти и блокировать кровеносные сосуды [32].

В последнее время был проведен ряд исследований, направленных на изучение ассоциации мутаций митохондриального генома с артериальной гипертензией. Описания этих исследований приведены ниже.

**4295A→G (tRNA-Ile).** Проанализированы клинические, генетические и молекулярные характеристики китайской семьи, включающей 3 поколения, с матерински наследуемой гипертонией. У всех родственников со стороны матери в этой семье гипертония проявлялась в различной степени с возраста от 36 до 56 лет. Анализ последовательностей митохондриальной ДНК в этой родословной показал наличие мутации тРНК-Ile 4295A→G, ранее известной как ассоциированной с кардиомиопатией, и 33 других вариантов, принадлежащих к азиатской гаплогруппе D4j. Наличие мутации 4295A→G в нескольких генетически не связанных семьях, страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями, и при этом отсутствие ее у 242 пациентов контроля, убедительно свидетельствует о том, что эта мутация ассоциирована с патогенезом сердечно-сосудистых заболеваний [16].

**4401A→G (tRNA-Gln и tRNA-Met).** Были исследованы клинические, генетические и молекулярные характеристики китайской семьи с матерински наследуемой гипертонией. Три из семи родственников по материнской линии в этой семье, имеющей четыре поколения, в различной степени были подвержены гипертонической болезни, которая начинала развиваться в возрасте от 35 до 60 лет. Анализ митохондриальной ДНК в этой родословной выявил новую гомоплазмическую мутацию 4401A→G. Эта мутация отсутствовала у 242 контрольных пациентов. Гомоплазмическая форма, слабое биохимическое проявление, позднее начало, и неполная пенетрантность артериальной гипертонии в этой семье позволяют предположить, что мутации 4401A→G недостаточно для получения клинического фенотипа. Таким образом, другие факторы, например, гены-модификаторы, влияние окружающей среды и личностные особенности, также могут способствовать развитию гипертонии у людей, несущих эту мутацию [23].

**4435A→G (tRNA-Met).** Проанализированы клинические, генетические и молекулярные характеристики китайской семьи с матерински наследуемой гипертонией. В этой семье родственники по материнской линии представлены людьми, в различной степени подверженными артериальной гипертонии, начинающей проявляться в возрасте от 44 до 55 лет. Анализ митохондриальной ДНК в этой родословной выявил новую гомоплазмическую мутацию 4435A→G [35].

**Кардиомиопатии** — это первичные невоспалительные поражения миокарда невыясненной этиологии, не связанные с клапанными пороками или внутрисердечными шунтами, артериальной или легочной гипертонией, ишемической болезнью сердца или системными заболеваниями (коллагенозы, амилоидоз, гемохроматоз и др.). Основные формы кардиомиопатии:

гипертрофическая (обструктивная и необструктивная), застойная (дилатационная) и рестриктивная (встречается редко).

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) — это увеличение размеров сердца вследствие диффузной гипертрофии стенок левого желудочка, реже только верхушки сердца. Частота ГКМП составляет 0,2%, смертность при этом заболевании 2—4%. Доказана наследственная природа ГКМП. Это так называемая «семейная гипертрофическая кардиомиопатия».

Застойная (дилатационная) кардиомиопатия (ДКМП) — это резкое расширение всех камер сердца в сочетании с незначительной их гипертрофией и неуклонно прогрессирующей, рефракторной к терапии сердечной недостаточностью, развитием тромбозов и тромбоэмболии. ДКМП составляют 9% от всех случаев сердечной недостаточности.

В последние годы было проведено большое количество генетических исследований по идентификации генов, ответственных за развитие гипертрофической кардиомиопатии. Большинство выявленных мутаций обнаружены в генах, кодирующих сократительные, регуляторные и структурные белки саркомера (структурной единицы миофиламентов кардиомиоцита). Выявлена связь заболевания с мутациями b-миозина тяжелых цепей [4, 15], миозин-связывающего белка С [14], сердечного тропонина Т [31], сердечного тропонина I [6], сердечного тропонина С, а-тропомиозина [11], легких цепей миозина обязательных и регуляторных [12], сердечного а-актина [20], а-миозина тяжелых цепей [7], тайтина [2, 24].

Матерински наследуемые кардиомиопатии обусловлены мутациями в митохондриальной ДНК. Ниже приведено описание исследований мутаций митохондриального генома, ассоциированных с развитием различных видов кардиомиопатии.

**m.4322dupC (tRNA-Ile).** Обнаружена новая гетероплазмическая мутация митохондриальной ДНК (m.4322dupC) в гене тРНК, связанная с изолированной дилатационной кардиомиопатией. Была произведена оценка гетероплазмы у пробанда семьи с заболеванием и у здоровых контрольных субъектов. Все исследованные члены семьи имели данную мутацию. Кроме того, на наличие мутации были проверены 350 здоровых индивидов, среди которых не было обнаружено никаких доказательств гетероплазмы [17].

**4300A→G (tRNA-Ile).** Большая семья с матерински наследуемой кардиомиопатией была исследована с целью описания ее клинических и молекулярных особенностей. Эхокардиография показала, в основном, симметричную гипертрофическую кардиомиопатию у 10 членов семьи. Болезнь имела неблаго-

приятное течение. Тяжелая сердечная недостаточность с последующим летальным исходом возникла у трех человек; один человек перенес трансплантацию сердца. Электрокардиографические или эхокардиографические признаки гипертрофии сердца при отсутствии серьезных клинических жалоб были обнаружены у 5 чел. Мутация A4300G была обнаружена в крови всех обследованных пациентов. Процент мутировавших мтДНК варьировал от 13 до 100% от общего числа геномов [8].

В исследовании, проведенном другими учеными, в сердечной ткани больного ребенка, умершего в возрасте 5 лет, из семьи с наследуемой гипертрофической кардиомиопатией, были выявлены серьезные недостатки митохондриальных ферментов дыхательной цепи, в то время как гистохимические и биохимические исследования скелетных мышц показали нормальные результаты. Определение нуклеотидной последовательности мтДНК выявило мутацию A4300G в гене, кодирующем тРНК изолейцина, при этом она была гомоплазмической у всех лиц, страдающих болезнью, и у других родственников по материнской линии. Патогенная роль этой мутации была подтверждена выявлением очень низкого стационарного уровня зрелой митохондриальной тРНК изолейцина в сердечной ткани лиц из двух семей, страдающих заболеванием [28].

**9997T→C (tRNA-Gly).** В митохондриальном геноме семьи, у членов которой проявлялась необструктивная кардиомиопатия, была обнаружена замена T на C в положении 9997 в гене, кодирующем tRNA(glycine). Эта мутация наследовалась строго по материнской линии и присутствовала только у членов семьи с клиническими признаками заболевания; при этом она не была обнаружена среди контрольных пациентов различных этнических групп. Степень гетероплазмии мтДНК коррелировала с тяжестью симптомов. У брата пробанда (пробанд умер в возрасте 8,5 лет от гипертрофической кардиомиопатии) уровень гетероплазмии по данной мутации в тканях сердечной мышцы составлял около 88%, у сестры пробанда — 72%, у его матери — 82%, у бабушки — 43% [19].

**3303C→T (tRNA-Leu).** У семи членов семьи с кардиомиопатией и миопатией была обнаружена новая мутация, замена C на T в позиции 3303 мтДНК. Пробанд, двое его братьев и сестер имели фатальную инфантильную кардиомиопатию, в то время как у трех родственников по материнской линии болезнь проявлялась в более позднем возрасте, как внезапная остановка сердца или как митохондриальная миопатия с кардиомиопатией. Мутация была гомоплазмической во всех тканях (в том числе крови) у пробанда и ее брата, но гетероплазмической в крови пяти мало-

симптомных или бессимптомных родственников по материнской линии. Ни один из 70 здоровых доноров не был носителем мутации. [25].

**3260A→G (tRNA-Leu).** Обнаружено, что гетероплазмическая точечная мутация 3260A→G митохондриальной ДНК связана с матерински наследуемой миопатией и кардиомиопатией [18, 36].

Таким образом, анализ случаев семейного наследования патологических признаков по материнской линии показывает, что среди заболеваний, ассоциированных с мутациями митохондриального генома, присутствуют такие социально значимые патологии, как артериальная гипертония, сахарный диабет 2-го типа и различные виды кардиомиопатии. При этом фенотипические проявления дефектов митохондриального генома зависят не только от наличия или отсутствия мутации, а также от количественного соотношения мутантной и нормальной мтДНК в клетках (процента гетероплазмии).

*Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.*

### Список литературы

1. **Аметов А.С.** Сахарный диабет 2-го типа. Основы патогенеза и терапии. — М., 2003.
2. **Иманов Б.Ж.** Генетические аспекты гипертрофической кардиомиопатии // Кардиология. — 2003. — №4. — С. 57—61.
3. *Русский медицинский журнал* // Кардиология: артериальная гипертония. — 1997. — Т. 5, №9. — С. 547—609.
4. **Селезнев Д.М., Габрусенко С.А., Парфенова Е.В.** и др. Роль мутаций в гене тяжелой цепи сердечного б-миозина в российской популяции больных с гипертрофической кардиомиопатией // Кардиология. — 2005. — №4. — С. 15—20.
5. **Сукерник Р.И., Дербенева О.А., Стариковская Е.Б.** и др. Митохондриальный геном и митохондриальные болезни человека // Генетика. — 2002. — Т. 38. — С. 161—170.
6. **Burton D., Abdullarazak H., Knott A.** Two mutations in troponin I that cause hypertrophic cardiomyopathy have contrasting effect on cardiac muscle contractility // *Biochemical J.* — 2002. — Vol. 362. — P. 443—451.
7. **Carniel E., Taylor M.R.G., Sinagra G.** et al.  $\alpha$ -myosin heavy chain. A sarcomeric gene associated with dilated and hypertrophic phenotypes of cardiomyopathy // *Circulation.* — 2005. — Vol. 112. — P. 54—59.
8. **Casali C., d'Amati G., Bernucci P.** et al. Maternally inherited cardiomyopathy: clinical and molecular characterization of a large kindred harboring the A4300G point mutation in mitochondrial deoxyribonucleic acid // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 1999. — Vol. 33(6). — P. 1584—1589.
9. **Chen F.L., Liu Y, Song X.Y.** et al. A novel mitochondrial DNA missense mutation at G3421A in a family with maternally inherited diabetes and deafness // *Mutat. Res.* — 2006. — Vol. 602(1—2). — P. 26—33.

10. Diabetes mellitus: a major risk factor for cardiovascular disease // A joint editorial statement by the American Diabetes Association et al. — 1999. — Vol. 100(10). — P. 1132–1133.
11. **Jongbloed R.J., Marcelis C.L., Doevendans P.A.** et al. Variable clinical manifestation of a novel missense mutation in the alpha-tropomyosin (TPM1) gene in familial hypertrophic cardiomyopathy // *J. Amer. Coll. Cardiology.* — 2003. — Vol. 41 (6). — P. 981–986.
12. **Kabaeva Z.T., Perrot A., Wolter B.** et al. Systematic analysis of the regulatory and essential myosin light chain genes: genetic variants and mutations in hypertrophic cardiomyopathy // *Eur. J. Human Genetics.* — 2002. — Vol. 10. — P. 741–748.
13. **Kameoka K., Isotani H., Tanaka K.** et al. Novel mitochondrial DNA mutation in tRNA(Lys) (8296A→G) associated with diabetes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1998. — Vol. 245(2). — P. 523–527.
14. **Konno T., Shimizu M., Ino H.** et al. A novel mutation in the cardiac myosin-binding protein C gene is responsible for hypertrophic cardiomyopathy with severe ventricular hypertrophy and sudden death // *Clin. Sci. (Lond.)*. — 2006. — Vol. 110, №1. — P. 125–131.
15. **Laredo R., Monserrat L., Hermida-Prieto M.** et al. Beta-myosin heavy-chain gene mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy // *Rev. Esp. Cardiology.* — 2006. — Vol. 59. — P. 1008–1018.
16. **Li Z., Liu Y., Yang L.** et al. Maternally inherited hypertension is associated with the mitochondrial tRNA(Ile) A4295G mutation in a Chinese family // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2008. — Vol. 367(4). — P. 906–911.
17. **Mahjoub S., Sternberg D., Boussaada R.** et al. A novel mitochondrial DNA tRNAIle (m.4322dupC) mutation associated with idiopathic dilated cardiomyopathy // *Diagn. Mol. Pathol.* — 2007. — Vol. 16(4). — P. 238–242.
18. **Mariotti C., Tiranti V., Carrara F.** et al. Defective respiratory capacity and mitochondrial protein synthesis in transforment cybrid harboring the tRNA-leu(UUR) mutation associated with maternally inherited myopathy and cardiomyopathy // *J. Clin. Invest.* — 1994. — Vol. 93. — P. 1102–1107.
19. **Merante F., Tein I., Benson L., Robinson B.H.** Maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy due to a novel T-to-C transition at nucleotide 9997 in the mitochondrial tRNA-glycine gene // *Am. J. Hum. Genet.* — 1994. — Vol. 55. — P. 437–446.
20. **Monserrat L., Hermida-Prieto M., Fernandez X.** et al. Mutation in the alpha-cardiac actin gene associated with apical hypertrophic cardiomyopathy, left ventricular non-compaction, and septal defects // *Eur. Heart J.* — 2007. — Vol. 28. — P. 1953–1961.
21. **Nomiyama T., Tanaka Y., Piao L.** et al. Accumulation of somatic mutation in mitochondrial DNA and atherosclerosis in diabetic patients // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2004. — Vol. 1011. — P. 193–204.
22. **Procopciuc L.M., Pop D., Zdrengha D., Jeleleanu G.** Genetic analysis of angiotensinogen gene polymorphisms (M235T and T174M) in Romanian patients with essential arterial hypertension // *Rom. J. Intern. Med.* — 2005. — Vol. 43(1–2). — P. 61–71.
23. **Ronghua Li, Yuqi Liu, Zongbin Li** et al. Failures in Mitochondrial tRNA<sup>Met</sup> and tRNA<sup>Gln</sup> Metabolism Caused by the Novel 4401A>G Mutation Are Involved in Essential Hypertension in a Han Chinese Family // *Hypertension.* — 2009. — P. 54–329.
24. **Satoh M., Takahashi M., Sakamoto T.** Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* — 1999. — Vol. 262. — P. 411–417.
25. **Silvestri G., Santorelli F.M., Shanske S.** et al. A new mtDNA mutation in the tRNA leu(UUR) gene is associated with maternally inherited cardiomyopathy // *Hum. Mut.* — 1994. — Vol. 3. — P. 37–43.
26. **Suzuki Y., Suzuki S., Hinokio Y.** et al. Diabetes associated with a novel 3264 mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) mutation // *Diabetes Care.* — 1997. — Vol. 20(7). — P. 1138–1140.
27. **Tawata M., Hayashi J.I., Isobe K.** et al. A new mitochondrial DNA mutation at 14577 T/C is probably a major pathogenic mutation for maternally inherited type 2 diabetes // *Diabetes.* — 2000. — Vol. 49(7). — P. 1269–1272.
28. **Taylor R.W., Giordano C., Davidson M.M.** et al. A homoplasmic mitochondrial transfer ribonucleic acid mutation as a cause of maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy // *J. Amer. Coll. Cardiology.* — 2003. — Vol. 41, №10. — P. 1786–1796.
29. **Unwin N., Gan D., Whiting D.** The IDF Diabetes Atlas: providing evidence, raising awareness and promoting action // *Diabetes Res. Clin. Pract.* — 2010. — Vol. 87(1). — P. 2–3.
30. **Van Den Ouweland J.M.W.** Mutations in mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness // *Nat. Genet.* — 1992. — 1. — P. 368–371.
31. **Varnava A., Elliot P., Baboonian C.** Histopathological features of sudden death in cardiac troponin T disease // *Circulation.* — 2001. — Vol. 104. — P. 1380–1384.
32. **Wong W.P., Knowles J.A., Morse J.H.** Comparative analysis of BMPR2 gene and its mutations in idiopathic pulmonary arterial hypertension // *Chest.* — 2005. — Vol. 128 (6 Suppl.). — P. 615S.
33. **Yang T., Lam C.W., Tsang M.W.** et al. Novel mitochondrial 16S rRNA mutation, 3200T→C, associated with adult-onset type 2 diabetes // *Chin. Med. J. (Engl.)*. — 2002. — Vol. 115(5). — P. 753–758.
34. **Yu P., Yu D.M., Liu D.M.** et al. Relationship between mutations of mitochondrial DNA ND1 gene and type 2 diabetes // *Chin. Med. J. (Engl.)*. — 2004. — Vol. 117(7). — P. 985–989.
35. **Yuqi Liu, Ronghua Li, Zongbin Li** et al. Mitochondrial Transfer RNAMet 4435A>G Mutation Is Associated With Maternally Inherited Hypertension in a Chinese Pedigree // *Hypertension.* — 2009. — Vol. 53. — P. 1083–1090.
36. **Zeviani M., Gellera C., Antozzi C.** et al. Maternally inherited myopathy and cardiomyopathy: association with mutation in mitochondrial DNA tRNA-leu(UUR) // *Lancet.* — 1991. — Vol. 338. — P. 143–147.

## Сведения об авторах:

Сазонова Маргарита Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН



М.А. Полякова<sup>1</sup>, Н.А. Гаврилова<sup>2</sup>

## Современные представления о патогенетических механизмах развития диабетической оптической нейропатии

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Федорова, 127486, Москва, Бескудниковский бульв., 59а

<sup>2</sup> Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико-стоматологический университет», Москва, Делегатская ул., 20, стр. 1

*Диабетическая оптическая нейропатия — поражение зрительного нерва вследствие сахарного диабета. Изменения зрительного нерва при сахарном диабете изучены значительно меньше, чем изменения сетчатой оболочки. Вместе с тем, по разным данным, диабетическая оптическая нейропатия обнаруживается у 7—24,3% больных сахарным диабетом. Изучение особенностей формирования патологии зрительного нерва при диабете представляет безусловный интерес. Работа посвящена изучению современных взглядов на патогенез диабетической оптической нейропатии. Рассматриваются две основные линии патогенеза: метаболическая, связанная с повреждающим действием диабетических изменений метаболизма на нервную ткань и сосудистая, в основе которой лежит ишемия и нарушение состояния эндоневрального кровотока.*

**Ключевые слова:** диабетическая оптическая нейропатия, сахарный диабет, мозговой нейротрофический фактор (BDNF), оксид азота (NO), эндотелин 1 (ET1)

М.А. Polyakova<sup>1</sup>, N.A. GavriloVA<sup>2</sup>

## The up-to-date conception about the pathogenic mechanisms of the diabetic optical neuropathy forming

<sup>1</sup> The academician S.N. Fyodorov Federal State Institution «Intersectoral Research and Technology Complex «Eye microsurgery», 59A, Beskudnikovsky blvd., 127486, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Moscow State University of Medicine and Dentistry, 20/1, Delegatskaya str., Moscow, Russia

*Diabetic Optical Neuropathy (DON) is the optical nerve damage induced by the Diabetes Mellitus. Optical nerve sufferings in Diabetes Mellitus were studied much less compare to the retinal changes. But according to the literature data, the DON has been detected in 7 to 24.3% of Diabetes Mellitus patients. That's why the investigators great interest refers to the optical nerve pathological changes pathways in Diabetes Mellitus studying. This article was focused to the up-to-date scientific views of the DON pathogenesis summarizing. Two basic ways of the DON pathogenesis were demonstrated: metabolic and vascular. The metabolic pathway was connected with the neural tissue damage induced by the diabetic changed metabolism. The vascular pathway was connected with the ischemia and endoneural blood flow malfunction.*

**Key words:** Diabetic Optical Neuropathy, diabetes mellitus, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), NO, endotelin 1

Основным проявлением диабетического поражения глаз является диабетическая ретинопатия (ДР). Вместе с тем, многие авторы отмечают, что морфофункциональные изменения при стойкой гипергликемии касаются практически всех звеньев зрительного анализатора [7, 8]. В связи с этим в последние годы возрос интерес к изучению диабетической оптической нейропатии (ДОН).

Изменения зрительного нерва при сахарном диабете (СД) изучены значительно меньше, чем изменения сетчатой оболочки. Долгое время считалось, что изменения зрительного нерва при СД носят вторич-

ный характер [7]. По данным разных авторов, частота поражения зрительного нерва при СД колеблется от 7 до 30% и зачастую развивается еще до появления изменений глазного дна [9, 14]. О том, что изменения, происходящие при СД в нейронах сетчатки и глии, предшествуют началу клинически очевидных сосудистых проявлений свидетельствуют нарушения цветовой и контрастной чувствительности, изменения ЭРГ зарегистрированные у пациентов до обнаружения сосудистых изменений, которые традиционно используются для диагностики ДР [15, 18, 27].

В настоящее время доказано, что фактическая частота диагностирования ДОН оказывается гораздо выше при применении специальных методик ее выявления [10]

**Для корреспонденции:** Полякова Марина Александровна, врач, ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова. E-mail: mplkv@bk.ru

В 1986 г. R. Klein предложил внести в классификацию *ДР* диабетическую оптическую нейропатию (*ДОН*). По его мнению, *ДОН* представляет собой повреждение зрительного нерва у пациентов с *СД* в результате патологических изменений микроциркуляторного русла с последующим развитием функциональных и структурных изменений волокон *ЭН*; нарушением нейронального метаболизма, продукции и транспорта нейротрофических факторов; демиелинизацией и замедлением проведения возбуждения по нервному волокну. Появление новой терминологии отразило принципиально новый этап в понимании патологических процессов, происходящих в зрительном нерве при диабете, поскольку термин *ДОН* включает в себя более широкое толкование многообразия механизмов и клинических проявлений поражения зрительного нерва.

Основные формы *ДОН* были описаны M. Algan с соавторами в 1993 г. [14]:

- 1) аксиальная оптическая нейропатия;
- 2) передняя ишемическая нейропатия;
- 3) острый отек диска зрительного нерва;
- 4) атрофия зрительного нерва.

В большинстве случаев *ДОН* протекает в хронической форме (98,1%) и лишь в 1,9% наблюдений — в острой [11].

Клинически хроническая форма *ДОН* проходит 3 стадии развития: начальную, проявляющуюся функциональными зрительными нарушениями; выраженную, характеризующуюся нарушениями гемодинамики и проводимости зрительного нерва; дистрофическую, обусловленную дегенерацией и деструкцией нервных волокон.

*Морфогенез ДОН* описан достаточно подробно. При гистологическом исследовании образцов тканей *ЭН*, взятых посмертно у больных *СД*, найдены патологические изменения, которые можно расценить как аксонопатию: уменьшение числа аксонов в зрительном нерве, появление очагов сегментарной демиелинизации. Кроме того, в зрительном нерве наблюдаются характерные изменения сосудов и соединительнотканых структур: пролиферация и гипертрофия эндотелиальных клеток, истончение и дубликация базально капилляров; увеличение числа запустевших капилляров (количество последних коррелирует с тяжестью нейропатии); уменьшение плотности эндоневрального капиллярного русла с агрегацией форменных элементов крови; увеличение интерфасцикулярных пространств и отложений коллагена [7].

В последнее десятилетие, благодаря появлению современных неинвазивных диагностических методов стала возможной прижизненная оценка морфологических изменений зрительного нерва у пациентов [12].

*Патогенезу ДОН* посвящены многочисленные научные публикации. В них рассматриваются две основные теории патогенеза: *метаболическая*, связанная с повреждающим действием продуктов диабетического метаболизма на нервную ткань и *сосудистая*, в основе которой лежит ишемия и нарушение гемодинамики зрительного нерва.

Метаболические механизмы развития *ДОН*, связывают с активацией полиолового пути метаболизма глюкозы, накоплением сорбитола, с последующим дефицитом миоинозитола, необходимого для синтеза фосфотидилинозитола — эндогенного фактора *Na/K-АТФазы* [24, 25]. Конечные продукты обмена глюкозы по сорбитоловому пути — фруктоза и сорбитол — плохо пенетрируют через клеточную мембрану и накапливаются внутри клетки, приводя к внутриклеточной гиперосмолярности, отеку и набуханию миелина и, как следствие, нарушению аксонального транспорта и к замедлению проводимости по нервным волокнам [20].

Таким образом, основными патогенетическими механизмами развития *ДОН* являются взаимосвязанные процессы аксональной демиелинизации и замедления проведения возбуждения по нервным волокнам.

Сосудистые механизмы патогенеза *ДОН* связываются с тремя типами структурных изменений микрососудов при диабете: утолщением базальной мембраны капилляров, селективной потерей перицитов сосудами, повреждением эндотелиальных клеток капилляров

*Утолщение базальной мембраны капилляров* сетчатки и зрительного нерва является отличительной чертой *ДР*: она увеличена в 3-5 раз по сравнению с контролем [28]. Этот процесс связывается с нарушением синтеза и деградацией матрикса базальной мембраны в результате проникновения в неё плазматического белковоподобного материала.

При селективной потере перицитов сосудами — появляются так называемые перициты-«призраки». Они представляют собой пустые карманы в базальной мембране, обозначающие место, из которого исчезли ранее содержащиеся там клетки. Электронная микроскопия подтверждает экстенсивную (пространственно широкую) дегенерацию цитоплазмы перицитов [28]. В недиабетических глазах отношение перицитов к эндотелиальным клетками приблизительно 1:1, тогда как при *СД* это соотношение равно 1:4, что предполагает потерю перицитов.

Повреждение эндотелиальных клеток, определяющее уровень проницаемости сосудистой стенки, при гипергликемии приводит к изменению тока крови, снижению способности эндотелиальных клеток отвечать на изменения перфузионного давления процессом ауторегуляции. Повреждение эндотелия, играю-

щего важную роль в поддержании целостности гемато-офтальмического барьера, приводит к увеличению сосудистой проницаемости. В процессе заболевания происходит гибель эндотелиальных клеток, остаются бесклеточные капилляры, которые становятся неперфузируемыми [2].

В настоящее время в патогенезе всех микрососудистых осложнений СД важную роль отводят эндотелиальной дисфункции. Известно, что ведущее место в патогенезе эндотелиальной дисфункции принадлежит оксиду азота (NO) — одному из наиболее значимых регуляторов эндотелиально-сосудистой системы, оказывающему сосудорасширяющее действие [4]. Доказана значимость снижения уровня NO при СД 1 в качестве прогностического фактора формирования и прогрессирования нейропатии [13]. Снижение уровня оксида азота менее 60 мкг/мл — неблагоприятный фактор в плане развития клинических признаков нейропатии в ближайшие два года.

Другой важнейший регулятор функционального состояния эндотелия — эндотелин 1 (ЕТ1), представляющий собой вазоконстрикторный полипептид, рассматриваемый как маркер и предиктор тяжести и исхода различных сосудистых заболеваний. Известно, что образование ЕТ1 происходит в эндотелиальных клетках. ЕТ1 действует на рецепторы гладкомышечных волокон сосудов, вызывая их сужение, а также на эндотелиальные клетки, способствуя высвобождению вазорелаксантов и факторов роста сосудов [19].

Воспалительные механизмы могут играть дополнительную роль в патогенезе диабетического сосудистого повреждения. Повышение лейкоцитарной адгезии индуцирует эндотелиальный апоптоз, проявляющийся сосудистой проницаемостью и неперфузируемостью капилляров. Роль воспалительных механизмов при нейропатии подтверждается положительным иммунопероксидазным окрашиванием морфологических препаратов сетчаток глаз пациентов с ДР на провоспалительные хемокины (моноцит-хемоаттрактантный протеин, RANTES и ICAM-1) [3]. Кроме того, отмечена корреляция сывороточных уровней воспалительных медиаторов с тяжестью ДР и ДОН.

В последние годы развитие ДОН рассматривают с позиций дисфункции нейротрофических факторов. Нейротрофические факторы — семейство полипептидных факторов, осуществляющих контроль за апоптозом, развитием, ростом и дифференцировкой нейронов [5]. Появились сведения, свидетельствующие о значении нейротрофических факторов, в частности цилиарного нейротрофического фактора (CNTF), фактора роста нервов (NGF) и мозгового нейротрофического фактора (BDNF) в развитии нейропатии [5, 24, 26].

В литературе сформулированы основные звенья патогенеза нейропатии, предполагающие участие нейротрофинов [21]. Роль нейротрофических факторов в генезе нейропатии подтверждается в первую очередь наличием самих эндогенных нейротрофических факторов, обеспечивающих выживание и нормальное функционирование нейронов; изменением уровней нейротрофических факторов при диабетическом периферическом поражении нейронов; регенерацией нейронов *in vitro* и *in vivo* у экспериментальных моделей с индуцированными диабетическими поражениями.

Доказано, что в развитии нейропатии немаловажную роль играют ангиогенные факторы, к которым относятся сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) и фактор роста фибробластов (*basic fibroblast growth factor*, bFGF). В литературе имеются данные о связи VEGF с развитием сосудистых осложнений при СД [17]. Среди ангиогенных эндотелиальных факторов немаловажное место занимает основной фактор роста фибробластов. В связи с тем, что bFGF оказывает значительное влияние на пролиферацию клеток, синтез внеклеточного матрикса, репаративные процессы в сосудах, представляет интерес изучение его роли в формировании диабетической полинейропатии [22].

Таким образом, развитие ДОН является многогранным патологическим процессом, в основе которого лежат как метаболические факторы — дисфункция и дисбаланс эндотелиальных и нейротрофических факторов (NO, ЕТ1, BDNF, VEGF, bFGF), так и сосудистые механизмы — утолщение базальной мембраны и повреждение эндотелиальных клеток капилляров, селективная потеря перicyтов сосудами. Перечисленные механизмы приводят к тому, что в зрительном нерве развиваются взаимосвязанные процессы аксональной демиелинизации, деструкции и замедления проведения возбуждения по нервным волокнам, которые составляют основу развития ДОН. Изучение патогенеза ДОН с учетом взаимосвязи дисбаланса эндотелиальных и нейротрофических факторов (NO, ЕТ1, BDNF, VEGF, bFGF) представляется перспективным направлением.

### Список литературы

1. Балаболкин М.И. Диабетология. — М., 2000.
2. Баринев А.Н. Клинические проявления, патогенез и лечение болевого синдрома при дистальной симметричной сенсомоторной диабетической полинейропатии: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — М., 2002. — С. 23.
3. Богданов Э.И., Талантов В.В., Мухамедзянов Р.З. Диабетические нейропатии: Обзор // Невролог. вестн. — 2000. — Т. 32, №3/4. — С. 59–67.
4. Бондарь И.А., Климонтов В.В., Поршеников И.А. Оксид азота и диабетические ангиопатии // Сахарный диабет. — 2000. — №3. — С. 9–11.

5. **Гомазков О.А.** Нейротрофические факторы мозга: Справочно-информационное издание. Электронная версия. — М., 2004.
6. **Дедов И.И., Фадеев В.В.** Введение в диабетологию: Руководство для врачей. — М., 1998.
7. **Жабоедов Г.Д., Скрипник Р.Л.** Диабетическая оптическая нейропатия // Офтальмологический журнал. — 2001. — №1. — С. 5—9.
8. **Калинин А.П., Можеренков В.П., Прокофьева Г.Л.** Офтальмоэндокринология. — М., 1998. — С. 43—77.
9. **Кацнельсон Л.А., Форофонова Т.И., Бушин А.Я.** Соудистые заболевания глаза. — М.: Медицина, 1990. — 270 с., С. 13—15.
10. **Недзвецкая О.В., Чумак С.А.** Клинические и функциональные особенности изменения зрительного нерва при ювенильной диабетической ретинопатии // Вестн. офтальмологии. — 2001. — №3. — С. 7—11.
11. **Скрипник Р.Л.** Повреждения зрительного нерва при сахарном диабете. Патогенез, клиника, диагностика, лечение: Дисс. на соискание ученой степени д.м.н. — Киев, 2004.
12. **Харлап С.И., Лихникевич Е.Н., Першин К.Б., Пашинова Н.Ф., Ширишков Ю.К.** Топография и ангиоархитектоника зрительного нерва по данным ультразвуковых методов исследования и трехмерного оптического анализа // Вестн. офтальмологии. — 2001. — №1. — С. 15—19.
13. **Цымбал Д.М.** Формирование и течение автономной нейропатии у детей, больных сахарным диабетом: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — Саратов, 2003, 22. — С. 47.
14. **Algan M., Ziegler O., Drouin P.** Optic neuropathy in diabetic subject // Diabete Metab. — 1993. — Vol. 19, №5. — P. 395—399.
15. **Della Sala S., Bertoni G., Somazzi L., Stubbe F., Wilkins A.J.** Impaired contrast sensitivity in diabetic patients with and without retinopathy: a new technique for rapid assessment // Br. J. Ophthalmol. — 1985. — Vol. 69. — P. 136—142.
16. **Ekberg K., Brismar T., Johansson B.L.** et al. Amelioration of sensory nerve dysfunction by C-Peptide in patients with type 1 // Diabetes. — 2003. — Vol. 52. — P. 536—541.
17. **Gharbia K., Sayed Mohamed, Muchaneta Kubara E.C.** et al. An association between diabetic microvascular complications and vascular endothelial growth factor (VEGF) // Kidney Forum. — 2000. — Vol. 2 (2). — P. 33—37.
18. **Juen S., Kieselbach G.F.** Electrophysiological changes in juvenile diabetics without retinopathy // Arch. Ophthalmol. — 1990. — Vol. 108. — P. 372—375.
19. **Kakizawa H., Itoh M., Itoh Y.** et al. The relationship between glycemic control and plasma vascular endothelial growth factor and endothelin1 concentration in diabetic patients // Metabolism. — 2004. — Vol. 53 (5). — P. 550—555.
20. **Kempler P.** Neuropathies. Nerve dysfunction of diabetic and other origin / Ed. by P. Kempler. — Berlin: Springer, 2002. — P. 49—69.
21. **Leininger P., Gina M.V., Brain Andrea M.** Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats // J. Peripher. Nerv. Syst. — 2004. — Vol. 9(1). — P. 26.
22. **Lobmann R., Schultz G., Lehnert H.** Proteases and the diabetic foot syndrome: mechanisms and therapeutic implications // Diabet. Care. — 2005. — Vol. 28. — P. 461—471.
23. **Malik R.A., Veves A.** Pathogenesis of human diabetic neuropathy. Diabetic neuropathy: clinical management: Totowa N.J.: Humana Press, 2007. — P. 231—242.
24. **Park K.S., Kim S.S., Kim J.C., Kim H.C., Im Y.S., Ahn C.W., Lee H.K.** Serum and tear levels of nerve growth factor in diabetic retinopathy patients // Am. J. Ophthalmol. — 2008. — Vol. 145. — P. 432—437.
25. **Rask-Madsen C., King G.L.** Proatherosclerotic mechanisms involving protein kinase C in diabetes and insulin resistance // Arteriosclerosis thrombosis and vascular biology. — 2005. — Vol. 25. — P. 487.
26. **Seki M., Tanaka T., Nawa H.** et al. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in early retinal neuropathy of streptozotocin-induced diabetes in rats: therapeutic potential of brain-derived neurotrophic factor for dopaminergic amacrine cells // Diabetes. — 2004. — Vol. 53 (9). — P. 2412—2419.
27. **Terasaki H., Hirose H., Miyake Y.** S-cone pathway sensitivity in diabetes measured with threshold versus intensity curves on flashed backgrounds // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 1996. — 37. — P. 680—684.
28. **Turgut N., Karasalioglu S., Kusukugurluoglu Y.** et al. Clinical utility of dorsal sural nerve conduction studies in healthy and diabetic children // Clin. Neurophysiology. — 2004. — Vol. 115. — P. 1452—1456.
29. **Waltenberger J.** Impaired collateral vessel development in diabetes: potential cellular mechanisms and therapeutic implications // Cardiovasc. Res. — 2001. — Vol. 49. — P. 554—560.

Поступила 12.03.2012

#### Сведения об авторах:

Гаврилова Наталья Александровна, проф., и.о. зав. кафедрой глазных болезней ФГБОУ «ММСУ» Минздравсоцразвития РФ

## Юбилей Ларисы Георгиевны Хетагуровой

27 мая исполнилось 75 лет со дня рождения заместителя председателя Проблемной комиссии «Хронобиология и хрономедицина» Российской академии медицинских наук, директора Института биомедицинских исследований Владикавказского научного центра РАН, зав. кафедрой патофизиологии Северо-Осетинской государственной медицинской академии, доктора медицинских наук, профессора Ларисы Георгиевны Хетагуровой.

Хетагурова Л.Г. окончила Северо-Осетинский государственный медицинский институт. В 1964 г. защитила кандидатскую диссертацию во Всесоюзном институте эндокринологии и химии гормонов МЗ СССР (г.Москва), а в 1992 г. — докторскую диссертацию в НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН (г.Москва).

Все эти годы — работа на кафедре патофизиологии Северо-Осетинской государственной медицинской академии: ассистент, старший преподаватель, доцент, профессор по специальности «патофизиология» с 1993 г. В период с 1972 по 1978 гг. вела специальный курс медицинской генетики, после предварительной подготовки на базе Института генетики АМН СССР. Параллельно в эти же годы Лариса Георгиевна создает в составе института службу научно-медицинской информации, которую возглавляла до 1989 г.

С открытием новых факультетов Л.Г. Хетагурова провела профилизацию преподавания патофизиологии для студентов педиатрического факультета, на котором читала систематический курс лекций по основному предмету, по клинической патофизиологии — для лечебного и педиатрического факультетов.

В 1996 г. инициативной группой ученых СОГМА, на базе Северо-Осетинской государственной медицинской академии был открыт научно-исследовательский институт. Лариса Георгиевна возглавила научно-исследовательскую работу института в качестве заместителя директора, а с 2002 г. и по настоящее время она — директор Института биомедицинских исследований Владикавказского научного центра Республики Северная Осетия-Алания. Л.Г. Хетагурова внесла неоценимый вклад в становление института. Институт биомедицинских исследований в сочетании с Северо-Осетинской государственной медицинской академией представляет собой фактически единый учебно-научный комплекс, обеспечивающий подготовку квалифицированных специалистов, разработку новых диагностических и лечебных технологий.

Профессор Хетагурова Л.Г. активно работает в области хронопатофизиологии, подтверждая ее роль в изучении патогенеза болезни на всех этапах ее ста-

новления. Результаты исследований опубликованы в статьях и монографиях, изданных на русском и английском языках. Автор более 400 печатных научных работ, в том числе 11 монографий: «Хронопатофизиология (доклинических нарушений здоровья)», «Chronopathophysiology of preclinical health impairments», «Chronopathology», «Хронопатология. Экспериментальные и кинические аспекты» и другие. Л.Г. Хетагурова — обладатель 10 патентов на изобретения.

Много времени и сил Л.Г. Хетагурова уделяет воспитанию и подготовке молодых научных кадров. Под ее научным руководством защищены 3 докторские и 17 кандидатских диссертаций. По инициативе Л.Г. Хетагуровой открыта базовая кафедра «Новые медицинские технологии», создана школа молодых специалистов в области хрономедицины.

Профессор Л.Г. Хетагурова — член Президиума Владикавказского научного центра РАН, научный редактор журнала «Владикавказский медико-биологический вестник», член редакционных коллегий ряда научно-практических журналов и докторского диссертационного Совета по специальности 14.00.16 — «Патофизиология» ГБОУ ВПО СОГМА Минздрава России.

Незаурядные организаторские способности, профессиональная компетентность, широкий кругозор, требовательность к себе и подчиненным в сочетании с чуткостью и доброжелательностью снискали Л.Г. Хетагуровой заслуженный авторитет и уважение у сотрудников института и академии.

За достигнутые успехи в профессиональной деятельности и вклад в отечественную науку Л.Г. Хетагурова награждена Почетной грамотой Президиума РАН, ей присвоены звания «Заслуженный деятель науки РСО-А», «Заслуженный работник здравоохранения Северной Осетии», «Заслуженный работник высшей школы РФ».

От всей души поздравляем Ларису Георгиевну Хетагурову с юбилеем! Желаем крепкого здоровья, благополучия и многих лет плодотворного творческого труда.

*Коллективы Института биомедицинских исследований Владикавказского научного центра РАН и Правительства РСО-Алания и кафедры патофизиологии Северо-Осетинской государственной медицинской академии.*

*Редакционная коллегия журнала Патологическая физиология и экспериментальная терапия присоединяется к поздравлениям и желает Ларисе Георгиевне дальнейших творческих успехов.*

## Правила оформления статей для публикации в журнале «Патологическая физиология и экспериментальная терапия»

1. Статьи, оформленные без соблюдения указанных правил, к рассмотрению не принимаются.

2. Все присланные работы обязательно проходят этап научного рецензирования, редакция оставляет за собой право сокращения публикуемых материалов и адаптации их к рубрикам журнала.

3. В редакцию направляются 2 экземпляра рукописи, которые сопровождаются направительным письмом учреждения, заверенным ответственным лицом, на имя главного редактора журнала. К рукописи прилагается электронный носитель (диск — CD), содержание которого должно быть идентичным принтерной распечатке.

4. Текст печатается в тестовом редакторе Word шрифтом Times, 14 кеглем, через 1,5 интервала на листе А4. Поля верхнее и нижнее — 2,5 см, поле слева — 3,5 см, поля справа — 1,5. Запрещается использование автоматических переносов. Внизу справа проставляется нумерация страниц.

5. Объем оригинальных статей не должен превышать 8 страниц; обзоров — 15; кратких сообщений — 3 страницы. Исключение — заказные обобщающие статьи, объем которых оговаривается редколлекгией с автором.

6. Оформление титульной страницы:

- имя, отчество, фамилия(и) автора(ов);
- название статьи (без аббревиатуры);
- полное официальное название учреждения и его полный почтовый адрес;
- принадлежность авторов к учреждению обозначается надстрочным индексом в порядке упоминания.

7. Оригинальная статья должна содержать разделы:

- введение (краткое обоснование цели);
- методика (с четким, легко воспроизводимым описанием);
- результаты и обсуждение;
- литература.

8. К оригинальной статье необходимо приложить резюме с ключевыми словами (на русском и английском языках). Резюме должно отражать основное содержание работы. В начале резюме приводятся УДК, фамилии авторов, затем название статьи. Резюме печатается на отдельной странице.

9. Статья тщательно выверяется автором(ами): формулы, таблицы, дозы визируются авторами на полях, латинские и греческие буквы помечаются на полях (лат., греч.).

10. Статья подписывается всеми авторами. На отдельной странице указываются полные сведения об авторах: ученая степень, ученое звание, должность, кафедра, отделение, почтовый и электронный адреса всех учреждений, телефоны.

11. Количество графического материала должно быть минимальным. Все цифровые данные должны сопровождаться соответствующими единицами в системе единиц СИ.

12. Таблицы должны быть компактными, названия должны точно соответствовать содержанию граф. Сокращения слов не допускается. Данные таблиц не

должны дублироваться графиками и повторяться в тексте статьи.

Обязательно указание методов, программ статистической обработки материала.

13. В формулах должны быть четко размечены все элементы: латинские буквы — синим, греческие — красным; индексы надстрочные ( $A^1$ ) и подстрочные ( $A_1$ ), буквы прописные (A) и строчные (a), сходные буквы и цифры (O, буква, 0, цифра).

14. Аббревиатура допускается только при первоначальном упоминании с указанием полного названия.

15. Цитируемая литература приводится в алфавитном порядке на отдельном листе. В статье, в квадратных скобках, дается ссылка на порядковый номер источника. В списке литературы сначала указываются отечественные авторы, потом иностранные. Работы отечественных авторов, опубликованные на иностранных языках, помещаются среди работ иностранных авторов в общем алфавитном порядке, а работы иностранных авторов, опубликованные на русском языке — среди работ отечественных авторов в общем алфавитном порядке.

Если цитируются несколько работ одного автора, их нужно указывать в хронологическом порядке. Статья, написанная коллективом авторов (более 4 авторов), помещается в списке литературы по фамилии первого автора, при этом указываются еще два автора, а далее ставится «и др.». Если авторов всего 4, то указываются все авторы. После фамилии авторов приводится полное название статьи, источник, год, том, номер, выпуск, страницы (от и до); для книг, сборников, авторефератов и диссертаций обязательно указать их точное название, издательство, город, год.

Книга, написанная коллективом авторов (более 4 человек), помещается в списке по ее названию, а далее через косую черту указываются фамилии трех авторов, далее ставится «и др.». В монографиях иностранных авторов, изданных на русском языке, после названия книги через двоеточие указывается с какого языка сделан перевод. Ссылки на неопубликованные работы, работы для ограниченного пользования, диссертации, рабочие документы ВОЗ не допускаются.

16. Направление в редакцию работ, опубликованных в других изданиях или же посланных для печати в другие редакции, не допускается.

17. Статьи, оформленные не по правилам, возвращаются авторам без рассмотрения.

18. Рукописи, не принятые к печати, авторам не возвращаются.

19. Датой поступления статьи считается время поступления ее окончательного (переработанного) варианта.

20. Плата с аспирантов за публикацию рукописей не взимается.

Статьи направляются по адресу: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8. УРАМН НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН. Редакция журнала «Патологическая физиология и экспериментальная терапия».