

**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-  
онных исследований 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.  
2013. №4. 1—136.

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

Тираж 300 экз.

© ООО «Издательство Гениус Медиа», 2013.

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.*

**№4, 2012**  
**ОКТАБРЬ—ДЕКАБРЬ**

## **РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ**

**Главный редактор Б.Б. Мороз**

**Ю.В. Архипенко, Е.И. Асташкин, С.В. Грачев,  
Н.С. Гурко (ответственный секретарь), Т.А. Гуськова,  
И.С. Гушин (зам. главного редактора), А.В. Ефремов,  
В.Б. Кошелев, Н.А. Крупина, А.А. Кубатиев,  
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.Я. 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>Гусев Е.Ю., Черешнев В.А.</b> Системное воспаление: теоретические и методологические подходы к описанию модели общепатологического процесса. Часть 1. Общая характеристика процесса . . . . .	3
<b>Сукоян Г.В.</b> Сигналы, строение, функция и дисфункция . . . . .	15
<b>Семченко В.В., Степанов С.С., Боголепов Н.Н., Еренев С.И.</b> Постишемическая реорганизация межнейронных синапсов неокортекса млекопитающих . . . . .	30
<b>Портниченко А.Г.</b> Факторы роста и адаптация миокарда к гипоксии . . . . .	35
<b>ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ</b>	
<b>Белкина Л.М., Смирнова Е.А., Шимкович М.В., Терехина О.Л., Горячева А.В., Чепурнова Д.А., Дауни Г.Ф., Маллет Р.Т., Манухина Е.Б.</b> Кардиопротекторный эффект адаптации к периодической нормобарической гипоксии у крыс . . . . .	45
<b>Горкун А.А., Сабурова И.Н., Кошелева Н.В., Зурина И.М., Пулин А.А., Шагидулин М.Ю., Онищенко Н.А., Репин В.С.</b> Эндотелиальные прогениторные клетки в мезенхимосфероиде пупочного канатика и их участие в процессах ангиогенеза и васкулогенеза при острой печеночной недостаточности . . . . .	50
<b>Собенин И.А., Жуковский Н.С., Карагодин В.П., Ковалев Л.И., Мясоедова В.А., Банфи К., Шишкин С.С., Орехов А.Н.</b> Изменения протеомного профиля интимы и медиа аорты человека при атеросклерозе . . . . .	54
<b>Сазонова М.А., Нурбаев С.Д., Чичева М.М., Митрофанов К.Ю., Орехов А.Н., Постнов А.Ю., Собенин И.А.</b> Детекция митохондриальных мутаций генов цитохромов В и С в липофиброзных бляшках интимы аорты человека (сообщение 1) . . . . .	62
<b>Сазонова М.А., Синёв В.В., Чичёва М.М., Митрофанов К.Ю., Желанкин А.В., Орехов А.Н., Собенин И.А.</b> Ассоциация гетероплазмы мутаций митохондриальных генов РНК с гомогенатами поражённой атеросклерозом интимы аорты . . . . .	67
<b>Сазонова М.А., Синёв В.В., Чичёва М.М., Желанкин А.В., Митрофанов К.Ю., Орехов А.Н., Собенин И.А.</b> Анализ гетероплазмы некоторых генов субъединиц NADH дегидрогеназы в гомогенатах атеросклеротического поражения интимы аорты (сообщение 3) . . . . .	71
<b>Пуговкин А.П., Верлов Н.А., Еркудов В.О., Ланда С.Б., Попов В.В., Прийма Н.Ф., Лебедева М.А., Панкова Н.Б., Эйгель М.Я.</b> Неинвазивная оценка показателей системной гемодинамики по результатам исследования периферических сосудов . . . . .	75
<b>Роткина А.С., Романова Е.П., Москвитцев А.А., Кубатиев А.А.</b> Динамика изменений АДП- и тромбин-индуцированной агрегационной активности тромбоцитов в присутствии избытка гомоцистеина <i>in vitro</i> . . . . .	80
<b>Лескова Г.Ф., Крыжановский Г.Н., Швец В.И., Краснополяский Ю.М.</b> Лечебное воздействие липосом при геморрагическом шоке (экспериментальное исследование) . . . . .	88
<b>Нечаев И.Н., Шкурников М.Ю., Максименко Д.Г.</b> Определение предрасположенности к развитию нарушений сердечно-сосудистой системы у молодых спортсменов Московского региона . . . . .	94
<b>Мензиков С.А., Карпова М.Н., Калинин М.В.</b> Активность $Cl^-$ , $HCO_3^-$ -активируемой $Mg^{2+}$ -АТФазы, сопряженной с $GABA_A$ -рецепторами нейрональных мембран мозга крыс, в присутствии пентилентетразола в экспериментах <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> . . . . .	98
<b>Коненков В.И., Макарова О.П., Бгатова Н.П.</b> Роль лимфатического дренажа в изменении активности цитокинов и функций нейтрофилов в крови крыс после термического ожога кожи . . . . .	103
<b>Асташкин Е.И., Широкая А.В., Егорова Н.Д., Орехова Н.С., Новикова А.Н., Наседкин А.Н., Грачев С.В.</b> Патофизиологические механизмы влияния экзогенного монооксида азота при полипозном риносинусите . . . . .	109
<b>Диланян М.Х., Новикова Н.И., Орлов А.А., Сабурова И.Н., Репин В.С., Евсеенков Э.Е.</b> Морфологическое исследование динамики замещения костного цемента Norian CRS® Fast Set™ <i>de novo</i> костной тканью на модели направленной остеointеграции нижней челюсти у крыс CD . . . . .	113
<b>Панченко Л.Ф., Пирожков С.В., Теребилина Н.Н., Наумова Т.А., Баронец В.Ю., Шойбонов Б.Б., Мерзликина Н.Н., Журавлева А.С.</b> Нарушения механизмов, контролирующих реакцию иммунных и печеночных клеток на эндотоксин, в патогенезе алкоголь-индуцированных заболеваний печени. Гипотеза «двойного удара» . . . . .	117
<b>Суханов Д.С., Артюшкова Е.Б., Дудка В.Т.</b> Сравнительное гепато- и эндотелиопротективное действие растворов ремаксола и S-аденозил-L-метионина при экспериментальном поражении печени противотуберкулезными препаратами основного ряда в сочетании с алкоголем . . . . .	128
<b>Соловьева Н.В., Шидакова Н.А., Соловьев А.Г., Кирпич И.А.</b> Изменения жирнокислотного состава сыворотки крови у больных с острым алкогольным психозом . . . . .	132

## CONTENTS

<b>Gusev E.Yu., Chereshev V.A.</b> Systemic inflammation: theoretical and methodological approaches to description of general pathological process model. Part I. General characteristic of the process . . . . .	3
<b>Sukoyan G.V.</b> Signalosome as therapeutic targets . . . . .	15
<b>Semchenko V.V., Stepanov S.S., Bogolepov N.N., Ereniev S.I.</b> Postischemic reorganization of mammals neocortex interneuronal synapses . . . . .	30
<b>Portnychenko A.G.</b> Growth factors and adaptation of myocardium to hypoxia . . . . .	35
<b>ORIGINAL ARTICLES</b>	
<b>Belkina L.M., Smirnova E.A., Shimkovich M.V., Terechina O.L., Goryacheva A.V., Chepurnova D.A., Downey H.F., Mallet R.T., Manukhina E.B.</b> Cardioprotective effect of the adaptation to periodic normobaric hypoxia in rats . . . . .	45
<b>Gorkun A.A., Saburina I.N., Kosheleva N.V., Zurina I.M., Pulin A.A., Shagidulin M.Iu., Onischenko N.A., Repin V.S.</b> Endothelial progenitor cells in umbilical cord-derived mezenhimosferoids and their participation in the processes of angiogenesis and vasculogenesis in acute liver failure . . . . .	50
<b>Sobenin I.A., Zhukovsky N.S., Karagodin V.P., Kovaljev L.I., Myasoedova V.A., Banfy K., Shishkin S.S., Orekhov A.N.</b> Protein profiles changes of human aorta intima and media in atherosclerosis process . . . . .	54
<b>Sazonova M.A., Nurbaev S.D., Chicheva M.M., Mitrofanov K.Yu., Orekhov A.N., Postnov A.Yu., Sobenin I.A.</b> Detection of mitochondrial mutations in genes of cytochromes B and C in lipofibrous plaques in intima of human aortas . . . . .	62
<b>Sazonova M.A., Sinyov V.V., Chicheva M.M., Mitrofanov K.Yu., Zhelankin A.V., Orekhov A.N., Sobenin I.A.</b> The association of heteroplasmy of mutations in mitochondrial RNA genes with homogenates of intima aorta affected with atherosclerosis . . . . .	67
<b>Sazonova M.A., Sinyov V.V., Chicheva M.M., Mitrofanov K.Yu., Zhelankin A.V., Orekhov A.N., Sobenin I.A.</b> The analysis of heteroplasmy of some subunits NADH dehydrogenase genes in homogenates of aortic intima atherosclerotic lesion . . . . .	71
<b>Pugovkin A.P., Verlov N.A., Yerkudov V.O., Landa S.B., Popov V.V., Priima N.F., Lebedeva M.A., Pankova N.B., Eygel M.Y.</b> Non-invasive assessment of systemic hemodynamics study of peripheral vessels . . . . .	75
<b>Rotkina A.S., Romanova E.P., Moskovtsev A.A., Kybatiev A.A.</b> Dynamics of changes of ADP-, thrombin-induced platelet aggregation activity in the presence of an excess of homocysteine <i>in vitro</i> . . . . .	80
<b>Leskova G.F., Kryzhanovskij G.N., Shvets V.I., Krasnopolsky U.M.</b> The treat effect of liposomes during haemorrhagic shock (experimental research) . . . . .	88
<b>Nechaev I.N., Shkurnikov M.U., Maximenko D.G.</b> Determination of susceptibility to the development of disorders of the cardiovascular system in young athletes in the Moscow region . . . . .	94
<b>Menzikov S.A., Karpova M.N., Kalinina M.V.</b> The activity of the $Cl^-$ , $HCO_3^-$ -activated $Mg^{2+}$ -ATPase coupled with $GABA_A$ -receptor of the neuronal membrane from rat brain in the presence pentylentetrazole both <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> experiences . . . . .	98
<b>Konenkov V.I., Makarova O.P., Bgatova N.P.</b> Role of the lymphatic drainage in change of cytokine activity of and neutrophil functions in rats after thermal skin burn . . . . .	103
<b>Astashkin E.I., Shirokaya A.V., Yegorova N.D., Orekhova N.S., Novikova A.N., Nasedkin A.N., Grachev S.V.</b> Pathophysiological mechanisms of influence of exogenous nitrogen monoxide polypous rhinosinusitis . . . . .	109
<b>Dilanyan M.H., Novikova N.I., Orlov A.A., Saburina I.N., Repin V.S., Yevseyenkov E.E.</b> Morphological study of dynamics of replacement of bone cement Norian CRS® Fast Set™ <i>de novo</i> bone on line model of osseointegration mandible rats CD . . . . .	113
<b>Panchenko L.F., Pirozhkov S.V., Terebilina N.N., Naumova T.A., Baronetz V.J., Shoibonov B.B., Merzhlikina N.N., Zhuravleva A.S.</b> Disturbances of the control mechanisms over immune and liver cell response to endotoxin and their role in pathogenesis of the alcohol-induced liver diseases. Hypothesis of Dual Strike . . . . .	117
<b>Sukhanov D.S., Artyushkova E.B., Dudka V.T.</b> Comparative hepato- and endotelioprotective effect of remaxol and S-adenosyl-L-methionine in experimental defeat of a liver by antituberculosis essential drugs in a combination to alcohol . . . . .	128
<b>Solovieva N.V., Shidakova N.A., Soloviev A.G., Kirpich I.A.</b> Changes fatty acid composition of blood serum of patients with acute alcoholic psychosis . . . . .	132

Е.Ю. Гусев, В.А. Черешнев

## **Системное воспаление: теоретические и методологические подходы к описанию модели общепатологического процесса. Часть 1. Общая характеристика процесса**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии  
Уральского отделения Российской академии наук, 620049, Екатеринбург, ул. Первомайская, 106

*В статье обсуждаются теоретические и методологические подходы к описанию системного воспаления как общепатологического процесса. Указывается, что создание модели системного воспаления потребует интегрирования клинических и экспериментальных, молекулярных и популяционных исследований.*

**Ключевые слова:** системное воспаление, моделирование, клеточный стресс, микроциркуляторные расстройства, нейроэндокринная дисфункция

E.Yu. Gusev, V.A. Chereshevnev

## **Systemic inflammation: theoretical and methodological approaches to description of general pathological process model. Part I. General characteristic of the process**

Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS, 106, Pervomayskaya str., Yekaterinburg, 620049, Russia

*Theoretical and methodological approaches to description of systemic inflammation as general pathological process are discussed. It is shown, that there is a need of integration of wide range of types of researches to develop a model of systemic inflammation.*

**Key words:** systemic inflammation, modeling, cellular stress, microcirculatory disorder, neuroendocrine disorders

В предыдущей публикации [7] мы остановились на целесообразности характеристики системного воспаления (СВ) как общепатологического процесса, классификации факторов системного повреждения, включая молекулы категории DAMP (danger-associated molecular patterns — молекулярные паттерны, ассоциированные с опасностью) и стадий клеточного стресса как функционального элемента воспалительного процесса, а также роли цитокинов как показателей системной воспалительной реакции (СВР).

В настоящее время накопилось большое количество научных данных, которые сложно систематизировать на основе классических представлений о воспалении. В общих чертах сущность подобного рода проблем немецкий мыслитель О. Шпенглер обозначил ещё в начале XX века: «точная наука приходит к самоуничтожению вследствие возрастающего уточнения собственной постановки вопросов и собственных методов», а

один из способов преодоления этой проблемы — как «художественное мастерство построение гипотез» [21]. Иначе говоря, знание деталей не означает понимания целого. Учитывая сложность процесса, любые частные механизмы и критерии СВ будут условны, а теоретические обобщения — субъективны. Эти и другие проблемы отчасти будут нивелироваться проверкой теории на практике при сопоставлении конкурирующих подходов различных авторов.

Модель СВ как типового патологического процесса должна, по нашему мнению, включать в себя следующие основные составляющие:

1. Краткое формальное определение процесса, обозначающего его суть;
2. Атрибуты СВ, отличающие его от классического воспаления;
3. Структура процессоконплекса СВ;
4. Основные методологические подходы изучения СВ;
5. Характеристика динамики процесса, классификация стадий и фаз;
6. Определение основных типовых вариантов развития;

**Для корреспонденции:** Гусев Евгений Юрьевич, д-р мед. наук, доцент, зав. лаб. иммунологии воспаления, ФГБУН «ИИФ» УрО РАН. E-mail: e.gusev@iip.uran.ru

7. Обозначение общебиологической и клинической значимости СВ.

**I. Определение СВ [2]:** «Системное воспаление — это типовой, мультисиндромный, фазоспецифичный (стадиоспецифичный при хроническом течении) патологический процесс, развивающийся при системном повреждении и характеризующийся тотальной воспалительной реактивностью эндотелиоцитов, плазменных и клеточных факторов крови, соединительной ткани, а на заключительных этапах, и микроциркуляторными расстройствами в жизненно важных органах и тканях». Определение классического воспаления [20]: «Воспаление — это возникшая в ходе эволюции реакция живых тканей организма на местные повреждения, она состоит из сложных поэтапных изменений микроциркуляторного русла, системы крови и соединительной ткани, которые направлены на изоляцию и устранение повреждающего агента, и восстановление (или замещение) поврежденных тканей». При определенных сходствах двух определений (это всё же родственные процессы), несомненные и различия, на них подробнее остановимся ниже.

## II. Основные атрибуты системного воспаления

1. Системное воспаление развивается в ответ на генерализованное действие факторов повреждения.

К факторам системного повреждения целесообразно отнести механизмы непосредственного повреждения тканей и факторы имитации или угрозы повреждения [7]. Общим свойством их действия является индукция провоспалительных стадий клеточного стресса. При этом классическое воспаление направлено на локализацию и нейтрализацию факторов местного, но не системного, повреждения.

2. Системное воспаление запускается после преодоления повреждающими факторами буферных систем противовоспалительной резистентности на уровне организма.

Первым барьером на пути генерализации повреждающих факторов выступают покровные ткани, вторым — очаг воспаления. При преодолении этих барьеров СВ развивается только в условиях несостоятельности противовоспалительной резистентности на системном уровне.

3. Сущность СВ определяет системное вовлечение механизмов, протективных при использовании только в очаге воспаления.

Генетически детерминированную программу воспаления можно разграничить на два уровня — первый, базовый или внутренний (по отношению к очагу воспаления) и второй или внешний. Механизмы первого уровня, прежде всего, отвечают за локализацию

и нейтрализацию факторов альтерации, а второго — за ресурсное обеспечение программы первого уровня, а также усиление буферных механизмов противовоспалительной резистентности. Основные звенья внутренней программы: активированные в очаге воспаления лейкоциты, макрофаги, тучные клетки, эндотелиоциты, система гемостаза и комплемента, калликреин-кининовая система. К механизмам второго (внешнего) уровня классического воспаления следует отнести: развитие провоспалительного варианта общего адаптационного синдрома (особенности — лихорадка, мышечная гиподинамия, психастения, выход нейтрофилов из сосудистого депо), острофазный ответ печени, усиление лейкоцитопоза в костном мозге и некоторые другие более частные процессы. Эти механизмы связаны с генерализацией цитокинов и других медиаторов воспаления из очага воспаления. При СВ механизмы обоих уровней проявляют себя системно, обуславливая эффект своего рода суперпозиции воспалительного процесса.

4. Определяющую роль при СВ играют эндотелиоциты и макрофаги-резиденты микрососудов, а не клетки-мигранты очага воспаления как при классическом воспалении.

При воспалении клетки эндотелия непосредственно взаимодействуют с другими клетками микрососудов (миоцитами, подоцитами), лейкоцитами, тромбоцитами, плазменными факторами, клетками периваскулярной соединительной ткани. В настоящее время доминирующая роль эндотелия микрососудов в развитии критических состояний, ассоциированных с микроциркуляторными расстройствами, не вызывает сомнений [22, 53, 80]. Количество эндотелиоцитов у человека максимально составляет до  $6 \times 10^{13}$  клеток [36] с общей массой до 1,5—2 кг, что обеспечивает их абсолютное количественное доминирование над другими провоспалительными клетками в зоне микроциркуляции. Морфофункционально клетки эндотелия неоднородны не только в различных отделах сосудистой сети, но они имеют и органно-тканевую специфику [36]. Это усложняет описание эндотелиальной системы как единого целого. Имеются сложности в стандартизации существующих методик оценки функции эндотелиоцитов и в интерпретации результатов полученных в системе *in vitro*. В то же время, современные методы не только экспериментальных исследований, но и прижизненного изучения эндотелиоцитов у человека (эндоваскулярная биопсия, культивирование эндотелия пупочных вен, выделение циркулирующих в кровотоке эндотелиоцитов) [35, 47] позволяют сделать обобщения относительно провоспалительных функций этих клеток.

Так, при воспалении более существенна роль эндотелиоцитов посткапиллярных венул (ПКВ) [92], где

реализуется адгезия и миграция лейкоцитов, микротромбообразование и экссудация [20, 66, 73]. Активированные эндотелиоциты продуцируют большой спектр медиаторов воспаления, включая провоспалительные эйкозаноиды: простагландины- $E_2$ , лейкотриен- $C_4$  и тромбоксаны при реципрокном снижении продукции простаглицина [36, 44, 94]; ключевые для идентификации СВ цитокины:  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IL-8$ , GM-CSF, M-CSF, G-CSF, MCP-1, RANTES, IP-10 [32, 58, 70], а в некоторых тканях и  $IL-10$  [93]; компоненты системы гемостаза: тканевой фактор, урокиназа и тканевой активатор плазминогена (tPA), ингибитор активаторов плазминогена 1 (PAI-1), тромбомодулин, антитромбин III, фактор Виллебранда, тромбоцитарный активатор, и др. [86, 91]; вазоконстрикторы и вазодилаторы [48]. В свою очередь, через наружные рецепторы эндотелиоциты активируются молекулами категории DAMP [28], тромбином, провоспалительными цитокинами и эйкозаноидами, гистамином, кининами, анафилакسينами комплемента (C3a и C5a) и другими медиаторами воспаления [29, 33, 36, 44, 51]. Эндотелиоциты экспрессируют широкий спектр индуцибельных рецепторов, а их плотность в ПКВ может на порядки превышать таковую в крупных артериях [36, 92]. Среди этих структур можно выделить рецепторы адгезии: P- и E-селектины (обеспечивают «роллинг» лейкоцитов) [90], ICAM-1, VCAM-1 («арест» лейкоцитов) [52], эндокан (конкурентно препятствует «аресту» лейкоцитов) [71], интегриновые рецепторы, а именно:  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_V\beta_3$  (VNR),  $\alpha_4\beta_7$ , и др. — они участвуют в миграции, механотрансдукции и ингибировании апоптоза эндотелиоцитов, в адгезии на них тромбоцитов и в ангиогенезе [61, 82, 84]. Эндотелиоциты экспрессируют конститутивно белки главного комплекса гистосовместимости (HLA) 1-го, а индуцибельно и 2-го класса [36, 63]. При этом P-селектин,  $IL-8$ , и фактор Виллебранда могут быстро мобилизоваться при активации эндотелиоцитов из гранул Вейбла—Палада [78]. Эндотелиоциты, особенно ПКВ, как и тромбоциты экспрессируют на своей поверхности Fc $\gamma$ RII-рецепторы (CD32), обеспечивающие активацию клеток при взаимодействии с IgG-содержащими иммунными комплексами [34, 87]. Свою роль в этом процессе могут играть рецепторы эндотелиоцитов к фрагментам комплемента — C1q, C3b (CR1) и C3bi (CR4) [49, 59]. Конститутивно эндотелиоциты экспрессируют ряд паттерн-распознающих рецепторов [7], включая ключевой для распознавания липополисахарида грамотрицательных бактерий (LPS) Toll-подобный рецептор 4 [25], а также специфичный для эндотелиоцитов scavenger («мусорщик») рецептор из семейства коллектинов — CL-P1, который связывает грамполо-

жительные и грамотрицательные бактерии, дрожжи, окисленные липопротеины низкой плотности [96].

По-видимому, ключевым механизмом микротромбообразования является индуцибельная экспрессия на эндотелиоцитах ПКВ и адгезированных моноцитах мембранной формы тканевого фактора (CD142) [86], а задействование этого рецептора приводит к патологической активации CD142<sup>+</sup>-клеток [81]. При активации эндотелиоцитов, особенно ПКВ, реципрокно снижается экспрессия ряда конститутивных рецепторов, прежде всего VE-кадгерин, ответственных за обеспечение контакта между этими клетками, вследствие чего между ними образуются зазоры [30, 36]. Тем самым создаются условия для экссудации при классическом воспалении, а при СВ — феномена «протекания капилляров». Деструкция гликокаликса у эндотелиоцитов, при нарастании рецепторов адгезии и секреции ими и активированными тромбоцитами растворимых кофакторов адгезии/агрегации (фактора Виллебранда и др.), являются частью причин развития сладж-феномена [20, 36]. Кроме того, к клеткам эндотелия относятся и макрофаги микрососудов. Они, прежде всего, локализируются в печени (клетки Купфера), а также селезенке, легких и некоторых других органах [11, 41]. В норме эти стромальные фагоциты отвечают за очистку крови от корпускулярного и растворимого высокомолекулярного «мусора», включая факторы повреждения, за счёт неактивационных механизмов, а при СВ подвергаются воспалительной трансформации и сами становятся источниками этих факторов [83].

В целом, в сравнении с очагом воспаления основные клеточные эффекторы СВ отличаются оседлостью, стабильностью популяционного состава, для них участие в процессе воспаления скорее является не основной, но экстремальной функцией. Для смены функционального стереотипа при развитии СВ эндотелиоциты должны преодолеть качественный порог своей активации за счет совокупности разнотипных сигналов, инициируемых одновременным задействованием сразу нескольких звеньев базовой программы воспаления, а иногда и одного (другие звенья при этом вовлекаются вторично). Так, с одной стороны, высокие концентрации LPS одновременно активируют: эндотелиоциты, различные типы лейкоцитов и макрофагов, тучные клетки, тромбоциты и систему комплемента [54, 65, 68, 88, 98]. С другой стороны, СВ может инициироваться мощной первичной активацией, например, мастоцитов при развитии анафилактического шока или системы гемостаза при действии некоторых биологических ядов, эмболии околоплодными водами [19]. Далее развитие процесса воспалительной трансформации эндотелиоцитов поддер-

живается вторичными факторами системного повреждения, включая продукты тканевого распада.

5. Системное воспаление характеризуется потерей «воспалительными» механизмами своей протективной основы и превращением их в движущую силу патологического процесса.

Как и любой другой генетически детерминированный процесс, классическое воспаление, являясь необходимым условием выживания многих биологических видов, может приобретать для конкретного организма антипротективное значение (например, при аллергическом или аутоиммунном процессе). Напротив, при СВ генерализованное задействование внутренних механизмов не имеет протективного значения по определению, поскольку они не предназначены для использования в таких условиях. Генерализация этих механизмов обуславливает феномен вторичного системного повреждения.

6. Системное воспаление — это саморазвивающийся за счёт вторичного системного повреждения процесс, который не имеет тенденции к самоизлечению.

Развитие феномена вторичного системного повреждения связано с эффектами флогогенных факторов во внутрисосудистой среде, вторичной недостаточностью функции внутренних органов, нарушением барьерной функции кишечного эпителия, развитием иммунодефицитного состояния, подавлением протективного классического воспаления, в совокупности провоцирующих поступление в кровотоки возрастающего количества микробных и эндогенных факторов повреждения. Развитие процесса по механизму положительной обратной связи делает его практически необратимым в естественных условиях и часто даже в условиях применения интенсивной терапии.

7. Динамика СВ определяется сменой фаз и стадий клеточного стресса на системном уровне.

Клеточный стресс можно подразделить на 3 стадии, где 2 и 3 стадия характеризуют провоспалительную трансформацию клеток [7]. При этом классическое воспаление определяется локальным развитием провоспалительного клеточного стресса, а СВ — генерализованным.

Можно рассмотреть все вышеприведённые положения и с другой точки зрения, сопоставив атрибуты СВ и классического воспаления [20]. Так, 5 классических внешних признаков воспаления Парацельса (жар, боль, гиперемия, отек, нарушение функции) прямо связать с СВ нельзя, поскольку есть варианты СВ не имеющих этих местных проявлений [2, 7, 19]. Общеизвестны [20] и другие атрибуты классического воспаления:

1) альтерации тканей;

2) выделение медиаторов воспаления и реакция микроциркуляторного русла;

3) миграция;

4) пролиферация.

Первые два пункта при СВ реализуются системно, а не местно, 3 и 4 пункты для СВ в принципе атрибутами не являются.

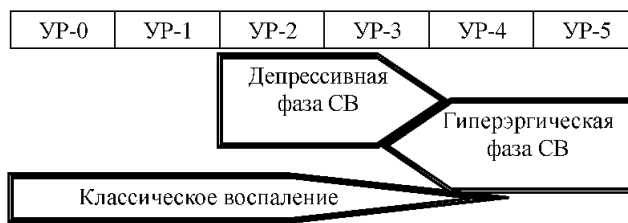
### III. Структура системного воспаления

Системное воспаление интегрирует большое число более частных процессов, связанных между собой причинно-следственными связями. Эти взаимосвязи носят нелинейный характер, а проявления даже крупных функциональных «блоков» СВ в целом имеют вероятностный характер. Получить единообразный вариант процессоконплекса СВ возможно только при применении ряда вынужденных условий и существенных упрощений. Для избежания терминологической путаницы мы обозначаем СВ как типовой патологический или общепатологический процесс, более частные его составляющие процессы — просто как феномены, а их составляющие — как субфеномены.

#### Феномен СВР

Вначале необходимо конкретизировать понятие СВР как частную составляющую СВ. Для решения этой задачи не могут быть востребованы существующие представления о СВР в «узком смысле» — критерии синдрома СВР, и в «широком смысле» — охватывающие всё, что угодно [7]. Поэтому мы определяем СВР как накопление в кровотоке медиаторов воспаления и других продуктов клеточного стресса в ответ на локальный (при классическом воспалении) или системный (при СВ) характер действия повреждающих факторов. При СВ вся масса активированного эндотелия, включая сосудистые макрофаги [57], продуцирует стресс-молекулы непосредственно в кровотоки, что позволяет зафиксировать в крови их уровни, критичные для развития СВ.

Между тем, рассмотрим и основные проблемы в оценке СВР. Во-первых, несмотря на то, что основная масса цитокинов и других медиаторов утилизируется в очаге воспаления, определённое их количество



Соотношение уровней СВР (УР), двух фаз СВ и острого классического воспаления

поступает в системный кровоток. При этом основная масса клеток, инфильтрирующих очаг воспаления, являются «профессиональными» индукторами воспаления с высоким уровнем флогенной активности. Следовательно, значительное накопление в крови показателей СВР может происходить и при классическом воспалении. Во-вторых, концентрации в крови маркеров СВР характеризуются, как правило, хаотичностью изменений, выраженной ненормальностью распределения и слабой корреляцией между собой [4, 5]. В-третьих, определённые фазы и стадии провоспалительного клеточного стресса характеризуются подавлением не только физиологических, но и экстремальных функций. В последнем случае скорее можно говорить не о провоспалительной реакции клеток, а об их депрессивном состоянии [7]. Таким образом, во многих случаях чётко разделить СВР при классическом воспалении, с одной стороны, и СВ, с другой, — затруднительно или невозможно, без оценки других феноменов СВ. В то же время эти обстоятельства требуют использования интегральных критериев для оценки СВР и подразделения СВР на ряд полуколичественных уровней реактивности (УР), отражающих ту или иную вероятность развития СВ. В этих целях мы выделили 6 принципиальных значений УР (0—5):

- УР-0 определяет физиологические колебания выбранных в качестве критериев стресс-молекул;
- УР-1 исключает острое СВ, но может характеризовать развитие СВР при классическом воспалении;
- УР-5 подтверждает наличие СВ;
- УР-2–4 формируют зону перекрытия между системным и классическим воспалением [4].

На рисунке показано соотношение значений УР, двух фаз острого СВ [5, 19] и острого классического воспаления.

В интегральные критерии УР целесообразно включать универсальные факторы СВР с понятной биологической значимостью, секретируемые многими типами клеток, включая эндотелиоциты и сосудистые макрофаги. В качестве конкретного варианта решения этой задачи рассчитывали значения УР на основе определения в крови С-реактивного белка и 4 цитокинов (IL-6, IL-10, IL-8, TNF $\alpha$ ) [4]. При этом ряд показателей, малоприспособленных для определения УР, могут быть критериями субфеноменов СВР для решения более частных задач [4].

#### *Феномен системной альтерации*

Генерализация факторов повреждения является атрибутивным признаком СВ. Феномен можно подразделить на ряд субфеноменов:

- проявление признаков системной тканевой деструкции, вследствие нарушения целостности клеток и экстраклеточного матрикса;
- генерализация эффекторов неспецифического тканевого повреждения — гидролаз, свободных радикалов, некоторых катионных и гидрофобных молекул, которые можно определить в кровотоке непосредственно или через вторичные изменения, например, продукты пероксидации;
- генерализация эндогенных и экзогенных индукторов клеточного стресса, относящихся к категории DAMP;
- изменения ключевых параметров гомеостаза, способных инициировать системный клеточный стресс и/или тканевые повреждения.

Таким образом, феномен интегрирует как процессы — предвестники повреждения, так и непосредственные эффекты повреждения. Наличие последних имеет более принципиальное значение, поскольку они чаще развиваются уже на фоне СВ и характеризуют определённые этапы его саморазвития. Учитывая это, мы выбрали в качестве основного критерия феномена определённые концентрации в крови маркеров повреждения мышечной ткани (миоглобина и тропонина I). При этом спектр молекулярных признаков феномена большой и соответственно существует возможность подбора критериев для решения конкретных задач.

#### *Феномен микроциркуляторных расстройств (МЦР)*

Необходимость выделения этого феномена как базового компонента СВ заключается в следующем:

1) МЦР являются ключевым патогенетическим звеном развития септического шока и ряда других шоковых состояний, а также большинства случаев развития синдрома полиорганной недостаточности (ПОН) и синдрома диссеминированного внутрисосудистого свёртывания крови (ДВС);

2) МЦР являются ключевым понятием для описания патогенеза этих процессов в системе общей патологии и медицине критических состояний;

3) системная воспалительная микроциркуляция является патогенетическим ядром декомпенсированных вариантов СВ, в этих случаях роль других звеньев патогенеза во многом определяется характером их взаимосвязи с МЦР;

4) МЦР интегрируют большое число более частных типовых процессов, имеющих самостоятельное значение для характеристики СВ.

Ключевую роль в развитии МЦР играют повреждение, патологическая активация и дисфункция эндотелия микрососудов [56]. Эти процессы можно оценить по накоплению в крови продуктов активации эндотелиоцитов [46, 72, 75, 76, 80] и сосудистых мак-

рофагов [37, 77], а именно: слушенных эндотелиоцитов; цитокинов, других медиаторов воспаления, ростовых факторов; растворимых форм индуцибельных рецепторов; окиси азота [13] и ряда белковых регуляторов сосудистого тонуса. Существенное значение имеет выявление стандартных маркеров ДВС-синдрома: чаще используются тромбоциты, фибриноген, D-димеры, фибрин-мономерные комплексы, анти-тромбин III и его комплекс с тромбином, протромбиновое время; реже — тромбоцитарный фактор 4, протеин C, tPA, PAI-1, комплекс плазмин +  $\alpha_2$ -антиплазмин, тромбиновое время и др. [37, 60, 75]. Определённое значение для оценки причинных механизмов МЦР имеют факторы активации нейтрофилов [43, 62] и мастоцитов [45], признаки сладж-феномена [16] и синдрома протекания капилляров [9]. Можно выделить несколько десятков эффективных для этих целей молекулярных показателей. Однако только некоторые из них абсолютно или относительно специфичны к эндотелиоцитам, а именно: растворимые формы рецепторов адгезии (E-селектина, эндотелина, VCAM-1, ICAM-1) и рецепторов фактора роста эндотелия сосудов (VEGF); отдельные компоненты системы гемостаза — tPA, PAI-1, растворимая форма тромбомодулина. Относительно высокой эффективностью в качестве критериев прогноза критических осложнений при сепсисе обладают растворимые рецепторы VEGF и эндотелин [71, 75]. Большинство других факторов эндотелиоза, как критерии СВ, имеют определённые ограничения по сравнению с ключевыми цитокинами [4]. Среди цитокинов плазмы крови — в существенной степени коррелируются с другими признаками эндотелиальной дисфункции уровни IL-8 и IL-6 [80, 97, 99].

Провоспалительная активность эндотелия зависит и от способности клеток обеспечивать обменные процессы. В частности, наблюдаемое при критическом сепсисе снижение потребления клетками кислорода, в условиях восстановленного его транспорта, некоторые авторы обозначают термином «микроциркуляторный и митохондриальный дистресс-синдром» [85]. В целом, молекулярные маркеры эндотелиоза имеют суррогатный характер для диагностики МЦР, но могут быть востребованы при комплексных исследованиях СВ.

Непосредственно визуализировать прижизненные изменения микроциркуляции у постели пациента способны современные технологии боковой тёмнопольной видеомикроскопии (SDF микроскоп) и ближней инфракрасной спектроскопии (NIRS технология) [39, 40, 79, 27]. В частности, эти методы позволяют полуколичественно оценить перфузию микрососудов и её неоднородность в глубоких слоях не только слизистых оболочек (обычно подъязычной области), но

и кожи (SDF), а также степень оксигенизации микроциркуляторного кровотока в мышечной ткани (NIRS). В экспериментах на животных объектом этих исследований являются и внутренние органы. Эти эксперименты в целом подтвердили и дополнили результаты более ранних прижизненных исследований МЦР у животных [20, 69]. Несмотря на определённую ограниченность научного материала по результатам использования этих методов можно прийти к следующим основным заключениям:

- МЦР провоцируют развитие ПОН независимо от состояния макрогемодинамики;
- МЦР не имеют определённой локализации и поражают как покровные, так и внутренние органы;
- принципиальные закономерности МЦР не имеют органной и видовой (у млекопитающих) специфичности, но могут иметь свои отличительные особенности;
- во внутренних органах, включая головной мозг [89], развитие МЦР предшествуют тканевому отёку, который можно рассматривать как декомпенсированное проявление МЦР;
- МЦР — это неоднородный процесс: нарушения перфузии в микроциркуляторных единицах носят прерывистый характер (отчасти из-за фазности проявлений коагуляционных и фибринолитических процессов), а зоны с устойчиво высокой и низкой перфузией могут находиться в нескольких миллиметрах друг от друга;
- МЦР на уровне целостного организма характеризуется мозаичностью, в частности в покровных тканях и скелетных мышцах могут фиксироваться зоны функциональной ишемии, вероятно связанные с компенсаторными механизмами централизации кровообращения. Возможно, для анализа неоднородности МЦР следует с новых позиций рассмотреть понятие «функциональный элемент органа», предложенное А.М. Чернухом [20].

Несмотря на свою очевидную перспективность для науки и медицинской практики, методы визуализации МЦР не позволяют в полной мере охарактеризовать этот процесс, в целом, и, тем более, все его частные составляющие. Одной из ключевой составляющей МЦР является ДВС-феномен. Это связано не только с клинической важностью ДВС-синдрома при критических состояниях [22, 60], но и с ролью системы гемостаза как звена базовой программы воспаления, наличием апробированных и общепринятых методов идентификации этого процесса [37, 95]. В своих работах мы обычно идентифицируем ДВС-феномен по наличию стандартных критериев ДВС-синдрома, а для скрининга латентных его проявлений используем уровень D-димеров [4]. Мы также полагаем, что МЦР нельзя ассоциировать с СВР (несмотря на их «пере-



кривание» на уровне отдельных субфеноменов), поскольку МЦР определяются не только реакцией клеток, но и их патологическим состоянием.

#### *Феномен полиорганной недостаточности*

Феномен включает в себя проявления ПОН и/или тяжёлого шока. Для идентификации феномена обычно используем шкалу SOFA, не потому, что мы считаем существующие клинические методы идентификации ПОН оптимальными, а по причине того, что они являются общепринятыми медицинскими стандартами [64]. Отсутствие подобных стандартов для экспериментальных животных, усложняет создание специфичных для конкретного вида критериев ПОН и СВ в целом. Впрочем, это не препятствует изучению у животных более частных процессов. Так, в моделях сепсиса, травмы и реакции «трансплантат против хозяина» у нечеловекообразных обезьян выявлено наличие осложнений, связанных с высокими концентрациями в крови цитокинов — IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF $\alpha$  [55], аналогичных синдромам ПОН и ДВС, острому респираторному дистресс-синдрому у человека.

#### *Феномен нейроэндокринной и метаболической дисфункции*

Этот феномен интегрирует различные изменения нейроэндокринного и метаболического статуса. Процесс СВ «деформирует» основные метаболические циклы, а именно: глюкозо-молочнокислый (его частный вариант — цикл Кори), глюкозо-жирнокислотный (цикл Рендла), глюкозо-аминокислотный (аланиновый цикл), циклы обмена холестерина и транспортных форм липидов. Изменения этих циклов, интегрирующих метаболические процессы, прежде всего в печени, жировой и мышечной тканях, в определённой степени напоминают метаболическую дисфункцию при сахарном диабете [38]. Развитие этих изменений связано не только с эффектами регуляторных метаболитов и нейроэндокринных факторов, но с прямым действием на метаболические процессы провоспалительных цитокинов, в частности TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 [26]. Клиническими проявлениями обозначенных изменений при острых критических состояниях являются — метаболический стресс-синдром [18], синдромы гиперметаболизма и гиперкатаболизма [8, 10]. Используются и экспериментальные модели этих состояний [42]. При ряде хронических заболеваний регистрируют: метаболический синдром, при котором может отмечаться гиперпродукция жировыми клетками широкого спектра провоспалительных цитокинов, включая — TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 [67]; MIA-синдром («истощение, воспаление, атеросклероз») при терминальной почечной

недостаточности [17, 24] и ряд других синдромальных образований. Скелетные мышцы, также как и другие ткани, не только воспринимают регуляторные сигналы медиаторов воспаления, но сами способны при патологической активации секретировать провоспалительные цитокины: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF $\alpha$  [50]. Так, у спортсменов после марафонской дистанции отмечается незначительное повышение в крови IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  (примерно, двукратное) и примерно 100-кратное возрастание уровня IL-6, отчасти связанное с микрповреждениями мышечной ткани [74]. Это ещё раз подтверждает универсальность провоспалительного клеточного стресса и его развитие даже в пограничной области между физиологией и патологией. Естественно при СВ, когда отмечаются массивные проявления деструкции мышечной ткани, эти изменения будут носить злокачественный характер.

Известные критерии синдрома СВР [31] имеют отношение именно к этому феномену, а точнее к развитию общего адаптационного синдрома: тахикардия и тахипное — к универсальным его проявлениям, а лейкоцитоз и лихорадка — к его «воспалительному» варианту, который может развиваться как при классическом, так и системном воспалении.

Для общей характеристики СВ имеют значение признаки дистресс-варианта общего адаптационного синдрома, прежде всего, дисфункции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, включая кортикальную недостаточность. В этих целях мы фиксируем наличие феномена по определённым значениям кортизола в крови [4]. Для рассмотрения более частных механизмов СВ, например, повреждающих эффектов мицелл жирных кислот при развитии метаболического стресс-синдрома или исследовании конкретных заболеваний и экспериментальных моделей может быть востребован широкий спектр частных показателей этого феномена.

#### *Феномен истощения буферных систем антивоспалительной резистентности*

Как уже отмечалось, развитие СВ связано с системным эффектом действия факторов повреждения, преодолевших барьер антивоспалительной резистентности. Факторы рассматриваемого феномена можно подразделить на классы:

1. Механизмы: а) связывания в кровотоке и б) утилизации в сосудистых макрофагах молекулярных (DAMP, иммунные комплексы, комплексы «протеиназы + антипротеиназы», окисленные и денатурированные белки...) и корпускулярных (микробы, модифицированные клетки и тромбоцитарные агрегаты...) факторов.

2. Протективные факторы, ограничивающие развитие системного клеточного стресса (прежде всего, эндотелиоцитов, сосудистых макрофагов, мастоцитов и внутрисосудистых лейкоцитов) и факторы-ингибиторы внутрисосудистой активации систем комплемента и гемостаза.

3. Буферные механизмы поддержания жизненно важных параметров гомеостаза, а именно, щелочно-кислотного равновесия, редокс-потенциала внутрисосудистой среды и др.

4. Функциональные резервы органных систем (нейроэндокринной и сердечнососудистой систем, печени, лёгких, почек и др.).

Все эти многочисленные механизмы действуют исходно до развития СВ, а также на этапе развития системного воспаления — от пограничных его проявлений до необратимого этапа. При системных проявлениях классического воспаления часть факторов феномена могут дополнительно мобилизоваться (например, при острофазном ответе печени) или, напротив, истощаться. Противостояние буферных систем и противовоспалительных механизмов проявляется в виде большого количества частных «столкновений», идущих с переменным успехом. Это в значительной степени и обуславливает эффект мозаичности проявления СВ, как между органами, так и внутри органов. Несмотря на наличие большого числа публикаций, посвящённых частным механизмам этой системы, мы не смогли до настоящего времени определить универсальные критерии этого феномена, но рассматриваем его как одну из ключевых составляющих СВ, перспективную для дальнейшего изучения.

Вопреки известному значению *дисфункции иммунной системы* при развитии сепсиса, мы не выделяем её как непосредственную составляющую процессоконтекста СВ. Во-первых, ключевую роль в развитии большинства вариантов СВ играют факторы не неиммунитета, а врождённого иммунитета, которые также относятся и к базовым механизмам воспаления. Во-вторых, лимфоидная ткань является одной из первых жертв действия различных неблагоприятных факторов, но быстро восстанавливается при их купировании. В-третьих, нарушения антибактериальной защиты также во многом определяются дисфункцией при СВ механизмов врождённого иммунитета, барьерных функций покровных тканей и протективного (классического) воспаления. Между тем, отдельные варианты СВ могут инициироваться иммунными механизмами, например при реакции «трансплантат против хозяина».

Для оценки взаимосвязи составляющих СВ одним из методологических подходов могут стать некоторые положения теории функциональных систем П.К. Анохина более известной при описании процес-

сов высшей нервной деятельности [1]. Функциональная система была определена им как «динамичная, саморегулируемая организация, избирательно объединяющая структуры и процессы на основе нервных и гуморальных механизмов регуляции для достижения полезных системе и организму в целом приспособительных результатов». При этом функциональные системы первого типа обеспечивают постоянство определенных констант внутренней среды. Основные звенья системы: афферентный синтез, формирование целевой установки и зависимого от неё акцептора результатов действия, эфферентный синтез (формирование программы действия), реализация программы и проверка результата акцептором, самоликвидация системы при достижении цели или при отсутствии конечного положительного результата — её адаптационные изменения. С этих позиций классическое воспаление вполне можно описать как своеобразную функциональную систему, направленную на локализацию и устранение повреждающих факторов и тканевого повреждения. Развитие протективных проявлений СВР можно трактовать как этап развития адаптационных изменений этой системы. Очевидно, воспаление будет объединять более частные функциональные системы различного уровня, направленные на обеспечение выживания отдельных клеток, органо-тканевых структур и организма в целом, при приоритетности последнего уровня, в условиях их противоречия.

Между тем далеко не любой патологический процесс можно уложить в эту схему. Так инфекция и опухолевый рост скорее являются функциональными антисистемами, имеющими паразитические по отношению к макроорганизму целевые установки. В основе этих систем лежит чужеродная или мутированная собственная генетическая программа. При воспалении могут формироваться и дисфункциональные системы, характерным признаком которых является отсутствие установки на паразитизм, выполнение генетически запрограммированной программы (например, удаление генетически чужеродного материала) с заведомо негативным для организма результатом, например, при аутоиммунном процессе. В ряде случаев функционирование этих систем приводит к их саморазвитию по принципу положительной обратной связи. Причинами формирования дисфункциональных систем являются те или иные сбои на любом этапе становления функциональных систем, но и реализация деятельности этих систем в непредназначенной для этого системе координат. Именно последняя причина, как мы полагаем, лежит в основе развития СВ. С этих позиций СВ нельзя рассматривать как целостную систему — скорее как совокупность функциональных и дисфункциональных систем различного уровня организации. При этом первые препятствуют развитию вто-

рых, но при развитии СВ их количество будет уменьшаться, а дисфункциональных — возрастать. Естественно, процессы формирования и расформирования этих систем будут динамичны и многовариантны. Рассматриваемый подход позволяет определить феномены СВ как зоны перекрытия различных систем, оценить направления их взаимосвязи и общую причину их нестабильности.

Таким образом, для описания принципиальной модели СВ нужно определиться с точкой приближения к изучаемому явлению для целостной его оценки [2, 4, 19]. Далее формализовать эту задачу в виде конкретных критериев процесса наиболее надёжным, технологичным и экономичным способом. С этой целью мы используем для исследования острых заболеваний шкалу-СВ, основанную на определении в баллах СВР (значения УР) и некоторых других феноменов СВ [5], а для скрининговой оценки хронического системного воспаления — шкалу-ХрСВ, основанную на тех же методологических принципах [6].

В целом, построение модели СВ как общепатологического процесса является прежде всего задачей общей патологии, но потребует интегрирования клинических и экспериментальных, молекулярных и популяционных исследований, использования как теоретических (математических и логических), так и когнитивно-эвристических подходов. Кроме того, автоматизация расчёта интегральных критериев СВ, визуализация его образа, анализ баз данных и создание на этой основе компьютерных программ [5] потребует использования передовых информационных технологий. Узким местом для решения этих задач является отсутствие общепринятой теории и классификации типовых патологических процессов, клеточного и тканевого стресса и нерешённость ряда других теоретических проблем. В настоящее время многопрофильные клинические и клиничко-образовательные медицинские центры экономически развитых стран нередко становятся завершающим звеном многоэтапных научно-исследовательских циклов. Это обстоятельство накладывает определённую специфику на характер теоретических обобщений (синдромальный подход), связанных с авторитетными в этой области клиницистами: R.C. Bone (1941—1997), J. Marshall, J.-L. Vincent, S. Orail и др., поскольку теория системного воспаления является реальным инструментом решения многих практических задач. Несмотря на известный вклад отечественных учёных в теорию воспаления, включая В.В. Подвысоцкого [15], И.И. Мечникова [12, 13], А.М. Чернуха [20], вклад Российской науки в данном случае не носит определяющего характера. Отчасти это связано с отсутствием комплексных, междисциплинарных программ.

### Список литературы

1. *Анохин П.К.* Биология и нейрофизиология условного рефлекса. — М., 1968.
2. *Гусев Е.Ю., Осипенко А.В.* Иммунология системного воспаления // Иммунология Урала. — 2001. — Т. 1, №1. — С. 4—8.
3. *Гусев Е.Ю., Юрченко Л.Н., Мазуров В.А.* и др. Программный комплекс «Доктор-хелп2» в качестве возможного элемента единого информационного пространства врача // Сборник статей IX Международного форума средств обеспечения безопасности государства «INTERPOLITEX-2005». — М., 2005. — С. 28—32.
4. *Гусев Е.Ю., Юрченко Л.Н., Черешнев В.А., Зотова Н.В.* Методология изучения системного воспаления // Цитокины и воспаление. — 2008. — Т. 7, №1. — С. 15—23.
5. *Гусев Е.Ю., Зотова Н.В.* Сепсис и теория системного воспаления // Клин. Анест. Реаним. — 2009. — Т. 6, №1. — С. 20—28.
6. *Гусев Е.Ю., Соломатина Л.В., Паньшина Е.В.* и др. Системное воспаление при хронической дисфункции трансплантированной почки // Нефрология и диализ. — 2011. — Т. 13, №2. — С. 82—88.
7. *Гусев Е.Ю., Черешнев В.А.* Системное воспаление: предпосылки несиндромального подхода // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2012.
8. *Дундаров З.А., Майоров В.М.* Основные проблемы проведения нутритивной поддержки у пациентов в критических состояниях // Новости хирургии. — 2009. — Т. 17, №2. — С. 119—129.
9. *Кузнецов Н.А., Родоман Г.В., Шалаева Т.И., Дынжинова Т.В.* Прогнозирование развития полиорганной недостаточности при сепсисе у больных с гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей // Хирургия. — 2007. — №5. — С. 42—45.
10. *Левит Д.А., Лейдерман И.Н., Левит А.Л.* «Антикатаболическая» нутритивная поддержка при системной воспалительной реакции с полиорганной дисфункцией: эффективность и целесообразность // Инфекции в хирургии. — 2008. — Т. 6, №4. — С. 43—47.
11. *Маянский А.Н., Маянский Д.Н.* Очерки о нейтрофиле и макрофаге. — Новосибирск, 1989.
12. *Маянский А.Н.* Современная эволюция идеи И.И. Мечникова о внутрисосудистом воспалении // Иммунология. — 1995. — №4. — С. 8—15.
13. *Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Реутов В.П.* Оксид азота и NO-синтаза в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях // Биохимия. — 2000. — Т. 65, №4. — С. 485—503.
14. *Мечников И.И.* Лекции о сравнительной патологии воспаления. — М., 1923.
15. *Подвысоцкий В.В.* Основы общей и экспериментальной патологии. — СПб., 1899.
16. *Роганова И.В., Храмова И.В.* Патогенетическая значимость сладж-феномена и синдрома микротромбообразования при гриппе у пациентов старшего возраста // Морфологические ведомости. — 2011. — №1. — С. 119—122.
17. *Соломатина Л.В., Журавлева Ю.А., Гусев Е.Ю.* Концепция MIA-синдрома при терминальной почечной недостаточности // Нефрология. — 2009. — Т. 13, №4. — С. 64—69.
18. *Титов В.Н.* Альбумин, транспорт насыщенных жирных кислот и метаболический стресс-синдром (обзор литературы) // Клин. лаб. диагностика. — 1999. — №4. — С. 3—11.

19. **Черешнев В.А., Гусев Е.Ю.** Иммунологические и патофизиологические механизмы системного воспаления // Медицинская иммунология. — 2012. — Т. 14, №1—2. — С. 9—20.
20. **Чернух А.М.** Воспаление (очерки патологии и экспериментальной терапии). — М.: Медицина, 1979.
21. **Шпенглер О.** Закат западного мира; Очерки морфологии мировой истории. Полное издание в одном томе / Пер. с нем. — М.: Альфа-Книга, 2010.
22. **Aird W.C.** Vascular bed-specific hemostasis: role of endothelium in sepsis pathogenesis // *Crit. Care Med.* — 2001. — Vol. 29 — P. 28—34.
23. **Aird W.C.** The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome // *Blood.* — 2003. — Vol. 101. — P. 3765—3777.
24. **Ardag I., Yilmaz Y., Kahvecioglu S.** et al. Clinical value of the malnutrition-inflammation-atherosclerosis syndrome for long-term predictor of cardiovascular mortality in patients with end-stage renal disease: a 5-year prospective study // *Nephron Clin. Pract.* — 2008. — Vol. 108, №2. — P. 99—105.
25. **Bell E.** Innate immunity: Endothelial cells as sentinels // *Nature Reviews Immunology.* — 2009. — Vol. 9. — P. 532—533.
26. **Benrick A.** Cytokines in metabolic functions. — Section of Endocrinology Institute of Neuroscience and Physiology The Sahlgrenska Academy at University of Gothenburg Sweden, 2008.
27. **Bezemer R., Bartels S.A., Bakker J., Ince C.** Clinical review: Clinical imaging of the sublingual microcirculation in the critically ill — where do we stand? // *Critical Care.* — 2012. — Vol. 16. — R. 224.
28. **Bianchil M.E.** DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger // *Journal of Leukocyte Biology.* — 2007. — Vol. 81, №1. — P. 1—5.
29. **Bossi F., Bulla R., Tedesco F.** Endothelial cells are a target of both complement and kinin system // *International Immunopharmacology.* — 2008. — Vol. 8, №2. — P. 143—147.
30. **Broermann A., Winderlich M., Block H.** et al. Dissociation of VE-PTP from VE-cadherin is required for leukocyte extravasation and for VEGF-induced vascular permeability in vivo // *J. Exp. Med.* — 2011. — Vol. 208, №12. — P. 2393—2401.
31. **Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B.** et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis // *Chest.* — 1992. — Vol. 101, №6. — P. 1644—1655.
32. **Brown Z., Gerritsen M.E., Carley W.W.** et al. Chemokine gene expression and secretion by cytokine-activated human microvascular endothelial cells. Differential regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in response to interferon-gamma // *Am. J. Pathol.* — 1994. — Vol. 145, №4. — P. 913—921.
33. **Brunn G.J., Saadi S., Platt J.L.** Differential regulation of endothelial cell activation by complement and IL-1 $\alpha$  // *Circ. Res.* — 2006. — Vol. 98, №6. — P. 793—800.
34. **Chacko G.W., Duchemin A.M., Coggeshall K.M.** et al. Clustering of the platelet Fc gamma receptor induces noncovalent association with the tyrosine kinase p72syk // *J. Biol. Chem.* — 1994. — Vol. 269, №51. — P. 32435—32440.
35. **Chouinard J.A., Rousseau J.A., Beaudoin J.-F.** Positron emission tomography detection of human endothelial cell and fibroblast monolayers: effect of pretreatment and cell density on 18FDG uptake // *Vasc. Cell.* — 2012. — Vol. 4, №5. — P.2—10.
36. **Cines D.B., Pollak E.S., Buck C.A.** et al. Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders // *Blood.* — 1998. — Vol. 91, №10. — P. 3527—3561.
37. **Croner R.S., Hoerer E., Kulu Y.** et al. Hepatic platelet and leukocyte adherence during endotoxemia // *Critical Care.* — 2006. — Vol. 10, №1. — R. 15.
38. Cytokine modulation of glucose metabolism in Pathophysiology of Shock, Sepsis, and Organ Failure / Eds. Schlag G., Redl H. — Berlin: Springer Verlag, 1993.
39. **De Backer D., Hollenberg S., Boerma C.** How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference // *Critical Care.* — 2007. — Vol. 11. — R. 101.
40. **De Backer D., Donadello K., Taccone F.S.** et al. Microcirculatory alterations: potential mechanisms and implications for therapy // *Annals of Intensive Care.* — 2011. — Vol. 1. — P. 27—34.
41. **Decker K.** Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells) // *Eur. J. Biochem.* — 1990. — Vol. 192, №2. — P. 245—261.
42. **Depke M., Fusch G., Domanska G.** et al. Hypermetabolic syndrome as a consequence of repeated psychological stress in mice // *Endocrinology.* — 2008. — Vol. 149, №6. — P. 2714—2723.
43. **Di Stasi M.R., Ley K.** Opening the flood-gates: how neutrophil-endothelial interactions regulate permeability // *Trends Immunol.* — 2009. — Vol. 30, №11. — P. 547—556.
44. **Dormond O., Bezzi M., Mariotti A., Ru C.** Prostaglandin E2 Promotes Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3-dependent Endothelial Cell Adhesion, Rac-activation, and Spreading through cAMP/PKA-dependent Signaling // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277, №48. — P. 45838—45846.
45. **Echtenacher B., Mannel D.N., Hultner L.** Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis // *Nature.* — 1996. — Vol. 381. — P. 75—77.
46. **Erdbruegger U., Haubitz M., Woywodt A.** Circulating endothelial cells: A novel marker of endothelial damage // *Clinica Chimica Acta.* — 2006. — Vol. 373. — P. 17—26.
47. **Fadini G.P., Avogaro A.** Cell-based methods for ex vivo evaluation of human endothelial biology // *Cardiovasc. Res.* — 2010. — Vol. 87, №1. — P. 12—21.
48. **Feletou M.** The Endothelium, Part I: Multiple Functions of the Endothelial Cells — Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators // *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function.* — San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences, 2011.
49. **Ghebrehiwet B., Feng X., Kumar R., Peerschke E.I.** Complement component C1q induces endothelial cell adhesion and spreading through a docking/signaling partnership of C1q receptors and integrins // *Int. Immunopharmacol.* — 2003. — Vol. 3. — P. 299—310.
50. **Goebels N., De Rossi M., Hohlfeld R.** The Role of Cytotoxic Effector Molecules and Cytokines in Inflammatory Myopathies // *Basic Appl. Myol.* — 1998. — Vol. 8, №5. — P. 389—397.
51. **Groschner K., Graier W.F., Kukovetz W.R.** Histamine induces K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and Cl<sup>-</sup> currents in human vascular endothelial cells. Role of ionic currents in stimulation of nitric oxide biosynthesis // *Circulation Research.* — 1994. — Vol. 75. — P. 304—314.
52. **Henninger D.D., Panes J., Eppihimer M.** et al. Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse // *The Journal of Immunology.* — 1997. — Vol. 158, №4. — P. 1825—1832.
53. **Hoffmann J.N., Fertmann J.M., Jauch K.W.** Microcirculatory disorders in sepsis and transplantation: therapy with natural coagulatory inhibitors antithrombin and activated protein C // *Current Opinion in Critical Care.* — 2006. — Vol. 12, №5. — P. 426—430.
54. **Hsueh W., Sun X., Rioja L.N., Gonzalez-Crussi F.** The role of the complement system in shock and tissue injury induced by tumour necrosis factor and endotoxin // *Immunology.* — 1990. — Vol. 70, №3. — P. 309—314.
55. **Hukkanen R.R., Liggitt H.D., Murnane R.D., Frevort C.W.** Systemic Inflammatory Response Syndrome in Non-human Primates Culminating in Multiple Organ Failure, Acute

Lung Injury, and Disseminated Intravascular Coagulation // Toxicologic Pathology. — 2009. — Vol. 37. — P. 799–804.

56. **Ince C.** The microcirculation is the moto of sepsis // Critical Care. — 2005. — Vol. 9, №4. — P. 13–19.

57. **Koo D.J., Chaurdy I.H., Wang P.** Kupffer Cells Are Responsible for Producing Inflammatory Cytokines and Hepatocellular Dysfunction during Early Sepsis // Journal of Surgical Research. — 1999. — Vol. 83, №2. — P. 151–157.

58. **Krishnaswamy G., Kelley J., Yerra L.J.** et al. Human Endothelium as a Source of Multifunctional Cytokines: Molecular Regulation and Possible Role in Human Disease // Journal of Interferon & Cytokine Research. — 1999. — Vol. 19, №2. — P. 91–104.

59. **Langegegen H., Berge K.E., Johnson E., Hetland G.** Human umbilical vein endothelial cells express complement receptor 1 (CD35) and complement receptor 4 (CD11c/CD18) in vitro // Inflammation. — 2002. — Vol. 3. — P. 103–110.

60. **Levi M., van der Poll T.** Inflammation and coagulation // Crit. Care Med. — 2010. — Vol. 38. — P. 26–34.

61. **Lian J., Guoping C., Shapiro S.S.** et al. Glycoprotein Ibalph can mediate endothelial cell migration on von Willebrand factor-containing substrata // Exp. Cell. Res. — 1999. — Vol. 252, №1. — P. 114–122.

62. **Lindbom L.** Regulation of vascular permeability by neutrophils in acute inflammation // Chem. Immunol. Allergy. — 2003. — Vol. 83. — P. 146–166.

63. **Mantovani A., Bussolino F., Dejana E.** Cytokine regulation of endothelial cell function // FASEB J. — 1992. — Vol. 6, №8. — P. 2591–2599.

64. **Marshall J.C.** Measuring organ dysfunction in the intensive care unit: why and how? // Canadian Journal of Anesthesia. — 2005. — Vol. 52. — P. 224–230.

65. **Medzhitov R.C., Janeway Jr.** Innate immune recognition: mechanisms and pathways // Immunol. Rev. — 2000. — Vol. 173. — P. 89–97.

66. **Mehta D., Malik A.B.** Signaling mechanisms regulating endothelial permeability // Physiological Reviews. — 2006. — Vol. 86. — P. 279–367.

67. **Monteiro R., Azevedo I.** Chronic Inflammation in Obesity and the Metabolic Syndrome // Mediators of Inflammation. — 2010. — ID 289645.

68. **Nakamura Y., Si Q.S., Kataoka K.** Lipopolysaccharide-induced microglial activation in culture: temporal profiles of morphological change and release of cytokines and nitric oxide. // Neurosci. Res. — 1999. — Vol. 35. — P. 95–100.

69. **Nakijima Y., Baudry N., Durante J., Vicaat E.** Microcirculation in intestinal villi: a comparison between hemorrhagic and endotoxin shock // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2001. — Vol. 164. — P. 1526–1530.

70. **Nilsen E.M., Johansen F.-E., Jahnsen F.L.** Cytokine profiles of cultured microvascular endothelial cells from the human intestine // Gut. — 1998. — Vol. 42. — P. 635–642.

71. **Parmentier E., de Freitas Caires N., Grigoriu B.** et al. Endocan (endothelial cell-specific molecule-1) as a pertinent biomarker of endothelial dysfunction in sepsis // Critical Care. — 2010. — Vol. 14, №2. — R. 55.

72. **Paulus P., Jennewein C., Zacharowski K.** Biomarkers of endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis? // Biomarkers. — 2011. — Vol. 16, №1. — P. 11–21.

73. **Pearson M.J., Lipowsky H.H.** Effect of Fibrinogen on Leukocyte Margination and Adhesion in Postcapillary Venules // Microcirculation. — 2004. — Vol. 11. — P. 295–306.

74. **Pedersen B.K.** Special Feature for the Olympics: Effects of Exercise on the Immune System // Immunology and Cell Biology. — 2000. — Vol. 78. — P. 532–535.

75. **Pierrakos C., Vincent J.-L.** Sepsis biomarkers: a review // Critical Care. — 2010. — Vol. 14. — R. 15.

76. **Rabelink T.J., de Boer H.C., van Zonneveld A.J.** Endothelial activation and circulating markers of endothelial activation in kidney disease // Nature Reviews Nephrology. — 2010. — Vol. 6. — P. 404–414.

77. **Ring A., Stremmel W.** The hepatic microvascular responses to sepsis // Semin. Thromb. Hemost. — 2000. — Vol. 26. — P. 589–594.

78. **Romani de Wit T., de Leeuw H.P., Rondajj M.G.** et al. Von Willebrand factor targets IL-8 to Weibel–Palade bodies in an endothelial cell line // Exp. Cell Res. — 2003. — Vol. 286, №1. — P. 67–74.

79. **Sakr Y., Dubois M.J., De Backer D.** et al. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock // Crit. Care Med. — 2004. — Vol. 32. — P. 1825–1831.

80. **Shapiro N.I., Schuetz P., Yano K.** et al. The association of endothelial cell signaling, severity of illness, and organ dysfunction in sepsis // Critical Care. — 2010. — Vol. 14. — R182.

81. **Sharma L., Melis E., Hickey M.J.** et al. The Cytoplasmic Domain of Tissue Factor Contributes to Leukocyte Recruitment and Death in Endotoxemia // Am. J. Pathol. — 2004. — Vol. 165, №1. — P. 331–340.

82. **Sheppard D.** Endothelial integrins and angiogenesis: not so simple anymore // J. Clin. Invest. — 2002. — Vol. 110. — P. 913–914.

83. **Sheth K., Duffy A., Nolan B.** et al. Activated neutrophils induce nitric oxide production in Kupffer cells // Shock. — 2000. — Vol. 14. — P. 380–385.

84. **Shyy J.Y., Chien S.** Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress // Circ. Res. — 2002. — Vol. 91, №9. — P. 769–775.

85. **Spronk P.E., Kanoore-Edul V.S., Ince C.** Microcirculatory and mitochondrial distress syndrome (MMDS): a new look at sepsis // Update in Intensive Care Emergency Medicine. — 2004. — Vol. 42. — P. 47–69.

86. **Strukova S.** Blood coagulation-dependent inflammation. Coagulation-dependent inflammation and inflammation-dependent thrombosis // Frontiers in Bioscience. — 2006. — Vol. 11. — P. 59–80.

87. **Sundgren N.C., Zhu W., Yuhanna I.S.** et al. Coupling of fcy receptor I to fcy receptor IIb by SRC kinase mediates C-reactive protein impairment of endothelial function // Circ. Res. — 2011. — Vol. 109, №10. — P. 1132–1140.

88. **Supajatura V., Ushio H., Nakao A.** et al. Protective Roles of Mast Cells Against Enterobacterial Infection Are Mediated by Toll-Like Receptor 4 // The Journal of Immunology. — 2001. — Vol. 167. — P. 2250–2256.

89. **Taccone F.S., Su F., Pierrakos C.** et al. Cerebral microcirculation is impaired during sepsis: an experimental study // Critical Care. — 2010. — Vol. 14, №4. — R. 140.

90. **Tedder T.F., Steeber D.A., Chen A., Engel P.** The selectins: vascular adhesion molecules // FASEB J. — 1995. — Vol. 9, №10. — P. 866–873.

91. **Thambyrajah J., Townend J.N.** Homocysteine and atherothrombosis — mechanisms for injury // European Heart Journal. — 2000. — Vol. 21. — P. 967–974.

92. **Thurston G., Baluk P., Hirata A., McDonald D.M.** Permeability-related changes revealed at endothelial cell borders in inflamed venules by lectin binding // Am. J. Physiol. — 1996. — Vol. 271. — P. 2547–2562.

93. **Verma S., Nakaoka R., Dohgu S., Banks W.A.** Release of cytokines by brain endothelial cells: A polarized response to lipopolysaccharide // Brain Behav. Immun. — 2006. — Vol. 20, №5. — P. 449–455.

94. **Walker T.S., Brown J.S., Hoover C.S., Morgan D.A.** Endothelial prostaglandin secretion: effects of typhus rickettsiae // J. Infect. Dis. — 1990. — Vol. 162, №5. — P. 1136–1144.

---

95. **Webster N.R.** Inflammation and the coagulation system // Br. J. Anaesth. — 2002. — Vol. 89, №2. — P. 216—220.

96. **Yoshida T., Tsuruta Y., Iwasaki M.** et al. SRCL/CL-P1 recognizes GalNAc and a carcinoma-associated antigen, Tn antigen // J. Biochem. — 2003. — Vol. 133, №3. — P. 271—277.

97. **Yoshimura T., Matsushima K., Oppenheim J.** et al. Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1) // J. Immunol. — 1987. — Vol. 139, №3. — P. 788—793.

98. **Zhang G., Han J., Welch E.J.** Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway // J. Immunol. — 2009. — Vol. 182, №12. — P. 7997—8004.

99. **Zimmerman G.A., Albertine K.H., Carveth H.J.** et al. Endothelial Activation in ARDS // Chest. — 1999. — Vol. 116, №1. — P. 18—24.

Поступила 12.10.12

#### Сведения об авторах:

Черешнев Валерий Александрович, д-р мед. наук, проф., академик РАН, академик РАМН, директор ФГБУН «ИИФ» УРО РАН

Г.В. Сукоян

## Сигнаლოსомы, строение, функция и дисфункция

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

Образование сигнаლოსом — важный механизм компартиментализации сигнальных путей в сложном механизме сигнальной трансдукции клетки и развитии порочных кругов поддержания и прогрессирования заболеваний. Белки, образующие платформы для построения сигнаლოსом, выполняют важную регуляторную роль в различных сигнальных путях, хотя прямо не принимают участие в выполнении функции, они взаимодействуют и/или связываются со множеством сигнальных путей, организуя их в комплексы и тем самым регулируют передачу сигнала и помогают локализации компонентов (компартиментализации) данного пути в специальной области клетки, например, плазматической мембране, цитоплазме, или ядре, комплексе Гольджи, эндосоме, Мх. Это приводит к переходной, но благоприятной ориентации отдельных молекул в пределах комплекса, позволяя быстрое взаимодействие с дополнительными компонентами. Сигнаლოსомы могут играть роль контролирующей систем совершения биологической работы и способности придания баланса между эффективностью, надежностью и способностью к развитию, позитивную и негативную обратную связь событий, синергетический или подавляющий механизм, составлять инструментарий клеточной биологии и патофизиологии.

**Ключевые слова:** сигнаლოსомы, сигнальные пути клетки, клеточная биология, клеточная патофизиологии

G.V. Sukoyan

## Signalosome as therapeutic targets

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

The proteins forming platforms for construction signalosome carry out a important regulatory role in various signal transduction pathways though directly don't take part in a function performance, they interact and/or connect with set of signaling pathways, integrate them in complexes and by that regulate a signal transduction and help for location of components a definite pathway in the special region of cell, for example, in sarcoplasm, cytoplasm or nuclea, in complex Goldji, endosome, mitochondria. Formation a signalosome is the important mechanism of compartmentalization signaling pathways in the complex mechanism of transduction of a cell and development of vicious circles of maintenance and progressing of diseases. All of this lead to transition but beneficial orientation of individual molecules in the complex frame, permit fast interaction with additional component. Signalosomes may to play a role of control system of fulfillment biological function and ability to maintenance a balance between efficiency, ability and development, positive and negative feedback connection of events, synergic or depress mechanism, to consist tools for cell biology and pathophysiology.

**Key words:** signalosome, signaling pathways, cell biology, cellular pathophysiology

Стремительное развитие фундаментальной науки, картирование генома клетки и развитие протеомики, достижения в понимании механизмов внутриклеточной передачи сигналов и регуляции клеточного цикла, предопределило появление в клинической практике препаратов с молекулярно-целенаправленным механизмом действия, в основе которого лежит трансформация (деремоделирование) патогенетической мишени заболевания — «таргетная» терапия [7, 11, 61]. Достижение прогресса в создании препаратов целенаправленного действия для лечения основных социально-значимых заболеваний неразрывно связано с пониманием регуляции

многочисленных сигнальных путей, модулей и каскадов, и определения ключевых сигнал-детектирующих и сигнал-передающих сигнальных молекул<sup>1</sup> [9, 66]. Многочисленные элементы сигнальных путей пре- и пост-кондиционирования, поддержания и прогрессирования сердечной недостаточности, нарушения синаптической пластичности и нейродегенеративных заболеваний, дисфунк-

<sup>1</sup> К сигнальным молекулам относятся вещества полярной (гормоны, нейромедиаторы, факторы роста, цитокины, эйкозаноиды и неполярной (стероидные гормоны, способные в отличие от полярных, проникать в клетку, проходя через липидный бислой мембран) структуры и внутриклеточные сигнальные мессенджеры (цАМФ, Ca<sup>2+</sup> и Ca<sup>2+</sup>-мобилизуемые мессенджеры, липидные мессенджеры, керамиды, мессенджеры протеинкиназ, активные киназы, передающие информацию в клетку, ядро). Из более чем 1 млрд белковых молекул клеток млекопитающих более 10% вовлечены в сигнальную трансдукцию.

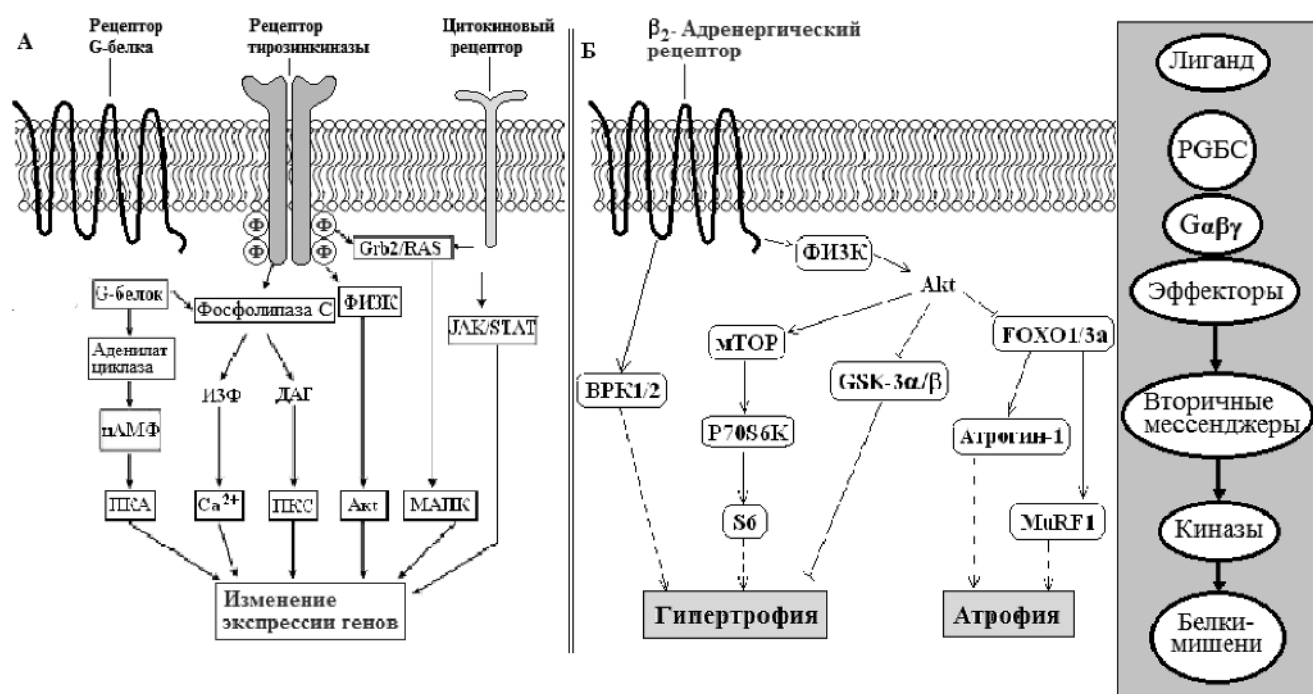


Рис. 1. Сигнальная трансдукция, приводящая через ряд последовательных сигнальных каскадов к экспрессии генов [38] и перекликанье сигнальных каскадов  $\beta_2$ -адренорецептора и фосфатидилинозит-3-киназный-протеникиназа В (Akt) сигнального пути *in vivo* [38, 66]. Активация сигнального пути регулируемой внутриклеточной киназой (ВРК-ERK) и сигнальной оси каскада пролиферации (мишени рифампицина млекопитающих (mTOR)/P70S6K/S6 (протеасомо-рибосомальные киназы) ведет к прогрессированию гипертрофии сердца. Норадреналин может также активировать  $\beta_2$ - и  $\beta_3$ -адренорецепторы, играющих важную роль в регуляции сердечной деятельности. В то же время активация Akt ведет к фосфорилированию гликогенсинтазы  $3\alpha/\beta$  и тем самым ингибирует прогрессирование гипертрофии. Akt индуцирует фосфорилирование FOXO (транскрипционный фактор семейства forkhead) 1/3a и ингибирует его активность, что негативно сказывается на активности атрогина-1 и мышечного up-regulation фактора транскрипции (MuRF-1), что в результате снижает скорость распада белков (атрофия). PKA и PKC – протеинкиназа А и С соответственно. РГБС – рецепторы, сопряженные с G-белком; DAG – диацилглицерол; МАПК – митоген-активируемая протеинкиназа; Grb2- 2 белок, связанный с рецептором фактора роста; RAS – мономерные мембраносвязанные G-белки, работающие как ГТФазы; JAK-STAT – янус киназа (тирозинкиназа); фосфорилирующие STAT-факторы (трансдукторы и активаторы сигнала транскрипции). Стрелка – повышение;  $\perp$  – ингибирование; сплошные линии – подтвержденные механизмы; пунктирные линии – гипотетические.

кции иммунной и бронхолегочной систем в настоящее время рассматриваются в качестве основных мишеней целенаправленной терапии [30]. Проблема осложняется тем, что в большинстве случаев процесс активации какого-либо метаболического процесса находится под контролем не одной, а нескольких систем внутриклеточной сигнализации, поэтому важным фактором ответа клеток служит взаимосвязь и так называемое перекликанье («crosstalk»<sup>2</sup>) этих систем (рис. 1А и Б).

Согласно классической теории, сигнальные молекулы и сигнальные рецепторы могут иметь разное строение и происхождение, однако все они работают по единому механизму. Связываясь со своим специфическим рецептором по принципу «ключ к замку», вызывают структурно-конформационные и биохимические изменения вдали от своего местоположения в

клетке. В результате сигнал извне клетки передается на внутриклеточную часть молекулы рецептора и запускает последовательный перенос сигнала от одной, внутриклеточной молекулы-передатчика к другой. Вне зависимости от того, на какую часть рецептора воздействуют препараты (антитела — на внеклеточный домен, малые молекулы — на рецепторные внутриклеточные киназы), рецептор является дистальным по отношению к геному, «узкой» частью сигнального пути и практически никогда не является непосредственным передатчиком пролиферативного или другого сигнала к геному клетки (рис. 1). Непосредственно взаимодействующими с определенными генами для срабатывания генетической программы, запущенной сигналом с рецептора (пролиферация, инвазия, ангиогенез, адгезия и т.д.), служат молекулы, находящиеся в конце сигнального пути. В большинстве клеток существуют дублирующие сигнальные пути, которые могут быть активированы конституционально — постоянно (при блокаде одного из сигнальных путей второй уже «готов» взять на себя его функции) или

<sup>2</sup> Crosstalk — тип интеграционного процесса, при котором индивидуальные ферменты получают сигналы от нескольких путей, основной сигнальный путь испытывает влияние со стороны другого, даже если этот второй путь не может полностью контролировать первый.



индукционно, по принципу обратной связи (начинают работать через некоторое время после начала блокады основного пути). Таким образом, передача сигнала от рецептора в плазматической мембране к ядру происходит путем диффузии компонентов цепи в цитозоле, а интернализация рецептора (его перемещение из мембраны внутрь клетки) является способом снижения его концентрации в плазматической мембране, способом тушения сигнала (что и происходит во многих случаях при транспорте рецепторов в лизосомы) [18]. Потенциально рецептор, может активировать большое количество молекул-лигандов, обеспечивая, таким образом, высокий коэффициент усиления внеклеточного сигнала [52]. Потребление в каскаде макроэргических соединений делает невозможным обращение цепи реакций или «смешивание» разных сигналов. Так, например, использование фосфодиэстеразой (ФДЭ) макроэргического субстрата цАМФ исключает возможность синтеза цАМФ из немакроэргического АМФ, а, следовательно, включение ферментного каскада повышающего концентрацию АМФ.

### Структура и функция сигналом

Динамическое образование больших мультимолекулярных сигнальных комплексов в процессе изменения локализации и внутриклеточного движения макромолекул<sup>3</sup>, подтвержденное экспериментально при различных внутриклеточных процессах [5, 10, 13, 15, 41, 42, 45, 48, 53, 58, 62, 65], имеет огромное значение для повышения эффективности передачи сигнала, обеспечения специфичности и повышения чувствительности [11, 54, 55, 65], стратегии компартментализации сигнальных комплексов в пространстве, секвестирования компонентов сигнального комплекса из остального пространства внутри клетки или в межклеточной жидкости [36, 48]. Процессы диффузии существенны для распространения информации внутри «открытого пространства», но они совершенно неэффективны и не могут обеспечить пропускную способность, чтобы быть

главной движущей силой огромного числа макромолекулярных взаимодействий в клетках [17]. Взаимодействие двух и более макромолекул претерпевает трехмерное свободное движение («random walk»), диффузию в открытом пространстве и зависит от концентрации и способности макромолекул к быстрому перемещению на большие расстояния [13]. По классической теории, при свободной диффузии в растворе, вероятность достижения мишени резко убывает с увеличением расстояния [36]. Более того, оказалось, что коэффициент диффузии для малых белков равен  $5 \times 10^{-7} \text{ см}^2 \text{ с}^{-1}$  в свободном пространстве, а в липидном бислое мембран  $5 \times 10^{-9} \text{ см}^2 \text{ с}^{-1}$  [11]. Взаимодействие между свободно-диффундирующими малыми молекулами (субстратами, в микромолекулярных концентрациях в клетке) и ферментами (белками, метаболитами) менее подвержены влиянию внутриклеточной скученности ввиду большой разницы в размерах растворенного вещества и «скопления» [66, 54]. Цитозольные белки экстенсивно гидратируются и структурная организация связанной воды приводит к фазовой сепарации структур от остального объема цитозоля. Минимизация фазовой границы, со своей стороны, вызывает соединение белков внутри их общей гидративной фазы. Если белки сигнального пути являются случайной распределенными в цитозоле, они также соединяются внутри в жидкостной фазе с потерей направленности и специфичности [11, 15]. Например, базальная концентрация цАМФ в основном объеме («bulk») цитоплазме кардиомиоцитов желудочков  $\sim 1 \text{ мкМоль}$ , что на порядок превышает уровень в  $\sim 100 \text{ нМоль}$  определенный в кавеоларных доменах с использованием протеинкиназа А (ПКА)-сенсоров [33, 37]. Было высказано предположение, что сигнальный каскад компартментализируется для осуществления метаболического каналирования, что в целом представляет собой взаимодействие с образованием белковых комплексов и их движения через цитозоль, как самостоятельной единицы. Сужение реакционного пространства и, компартментализация сигнальных путей становятся энергетически выгодными. Внутриклеточные структуры, например, комплекс Гольджи, саркоплазматический ретикулум (СР) и митохондрии (Мх), в результате могут функционировать как единые переходные зоны для молекул, передающих сигнал [61]. Таким образом, компартментализация играет важную роль даже в условиях покоя для поддержания уровня сигнальных молекул, например, концентрация цАМФ в микродоменах (локально) значительно ниже, чем в основном объеме цитоплазмы клетки и тем самым рецептор-сигнальные механизмы модулируют активность цАМФ в интервале, который характерен для работы высокоафинных эффекторов, таких, как ПКА II с константой диссоциации (Кд) порядка  $300 \text{ нМ}$  [35, 37].

<sup>3</sup> К данным методическим подходам относятся: усовершенствование методов конфокальной лазерной сканирующей и флуоресцентной микроскопии, криоэлектронной томографии для визуализации внутриклеточных структуры с разрешением до 4—5 нм, методы микроскопии с вычислительным анализом для воссоздания полного и всеобъемлющего пространственного молекулярного атласа интактной клетки, электронной и крио-электронной микроскопии в сочетании с техникой остановленного потока, количественной масспектрометрии, методов флуоресцентных зондов и флуоресцентной колебательной и методами и получением изображения в реальном времени (lifetime imaging), метода восстановления флуоресценции после фотоотбеливания для определения константы скорости и коэффициенты диффузии перемещающихся молекул в клетке, доли подвижных и неподвижных изучаемых молекул, методы радиационной инактивации, плазменной и ядерной резонансной спектроскопии, абсорбционной спектроскопии, с соответствующими биохимическими атомно-силовой микроскопии [5].

Сигнальные структуры могут обладать разнообразными свойствами: быть центрами связывания ионов, молекул и белков; обладать ферментативной активностью; образовывать каналы и межклеточные контакты; служить матрицей, организующей взаимодействие молекул в синтетических и транспортных процессах; служить рецепторами сигнальных молекул и основой для построения еще более сложных надмолекулярных структур. Эти структуры «вспыхивают» в пространстве клетки подобно сигнальным огням, выполняют свою роль и исчезают, чтобы появиться вновь в другом месте и в другое время. Смысл существования структурных «вспышек» в том, что при переходе в активное состояние клетке необходимы новые ресурсы, функции, механизмы, регуляторы и сигналы. Как только клетка переходит в состояние покоя, необходимость в этих структурах исчезает и они разбираются. Основная предпосылка для создания сигнальных градиентов — пространственная сегрегация противостоящих реакций (например, киназа и фосфатаза), существование градиента фосфорилированных белков (ВОХ 3) — высокие концентрации фосфорилированных белков примакают к мембранам, а низкие находятся в цитозоле [40]. На основании измерения значений диффузионной способности белков, активности киназ и фосфатаз, было показано, что во внутриклеточном пространстве существует большой градиент фосфопротеинов. Сильное связывание киназ в мембранах и цитозольная локализация фосфатаз, могла бы привести к неблагоприятным градиентам для переносчиков сигналов фосфорилирования, их распространению исключительно процессами диффузии, что препятствовало бы переносу информации [40]. Однако внутриклеточное проникновение биорегуляторов требует некоторого времени, поэтому их прямые внутриядерные и внутриклеточные эффекты носят отсроченный характер, а специфичность сигнализации достигается путем компартиментализации сигнальных комплексов в определенных участках мембраны. Затем внутриклеточные регуляторы-посланники, получив важные инструкции, обычно в результате посттрансляционных структурных модификаций, изменяют свою активность и вносят поправки в работу отдельных генов. Чаще всего рецептор собирается в комплекс с большим количеством белков с разными функциями, которые передают и распространяют сигнал, или ингибируют сигнал путем лимитирования времени жизни данного мультибелкового комплекса [11, 52]. Мультидоменные структурные и многомолекулярные белковые комплексы сигнальных макромолекул, состоящих из уникальных комбинаций компонентов сигнальных путей, мишеней поражения действия фармакологических средств, солокализованные с белками адапторами, получили название *сигнаლოსомы* [4, 12, 13, 15, 20, 27, 29, 36, 41, 44, 45, 46, 48, 51,

65]. Образование сигнаლოსом является ключевым механизмом выделения сигнального белка в специфическом субклеточном окружении, обеспечивая тем самым, способность белка (фермента) находиться вблизи соответствующих мишеней действия и предотвращать беспорядочную активность белков (ферментов) (рис. 2). Механизм регуляции образования и распада сигнаლოსом остается неизвестным. Установлено, что передача сигнала зависит от образования, несмотря большую скученность молекул во внутриклеточной среде, супрамолекулярных высокоориентированных белковых ансамблей (сигнаლოსом) в определенных клеточных компартаментах [44, 46]. Функционирование сигнаლოსом и их стабильность зависит от специфичности белок-белкового взаимодействия между сигнальными партнерами в ее составе, и обусловлено, в основном, свойствами, заложенными на ранних стадиях после их синтеза и структурно-конформационными свойствами мембран как структур с белково-липидной организацией [57, 58].

#### Сигнаლოსомы различных систем организма

Первое экспериментальное подтверждение сигнаლოსомная теория получила при визуализации сигнаლოსомы, образуемой при передаче сигнала в фоторецепторах *Drosophila*, вызванного световым стимулом (родопсином), с включением мультивалентного PDZ-домена белка InaD (форецептор специфический белок, Inactivation no afterpotential D (InaD)), эффектора фосфолипазы C (ФЛС), TRP (переходный потенциал рецептора)<sup>1</sup>-канала и регуляторной ПКС (рис. 3). Эволюционно стабильным мультифункциональным белковым комплексом является COP 9 сигнаლოსома (CSN), вовлеченная в регуляцию убихинон лигаз. Этот комплекс состоит из 8 субъединиц (Csn 1-8) собранных в ансамбли в форме частиц с м.м. 450 кДа. Интересно, что COP9-сигнаლოსома образует последовательность 1:1 с 19S протеасомой, что предполагает общность их происхождения [15].

Образование сигнаლოსом из компонентов сигнальных путей и модулей, вовлеченных в пространственно-временную передачу сигналов в пределах клетки, координируют платформенные («scaffold») белки, открытые более 15 лет назад [13, 17, 52, 56]. Сигнальные комплексы состоят из ферментов, например, киназ и фосфатаз, их субстратов и адапторных/платформенных белков (рис. 3)<sup>4</sup> которые прикрепляется с использованием модулированных доменов белок-белковых взаимодействий [10]. Платформенные белки располагаются исключительно в доменах взаимодействия при сниженной активности фер-

<sup>4</sup> Различия между адапторными и «scaffold» белками заключается в том, что адапторные белки являются связующими между двумя белками-партнерами, тогда как «scaffold» белки между тремя и более [10].

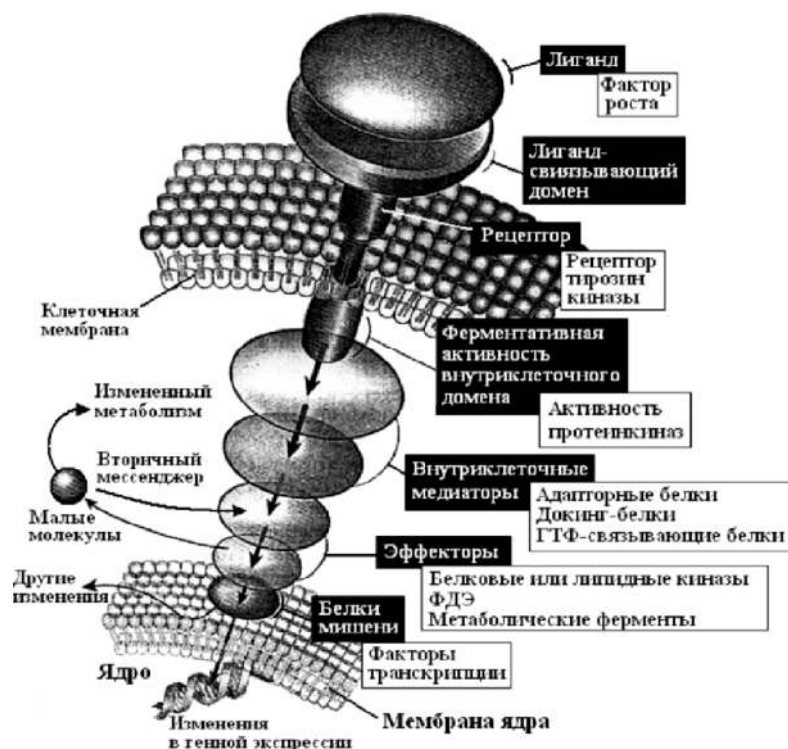
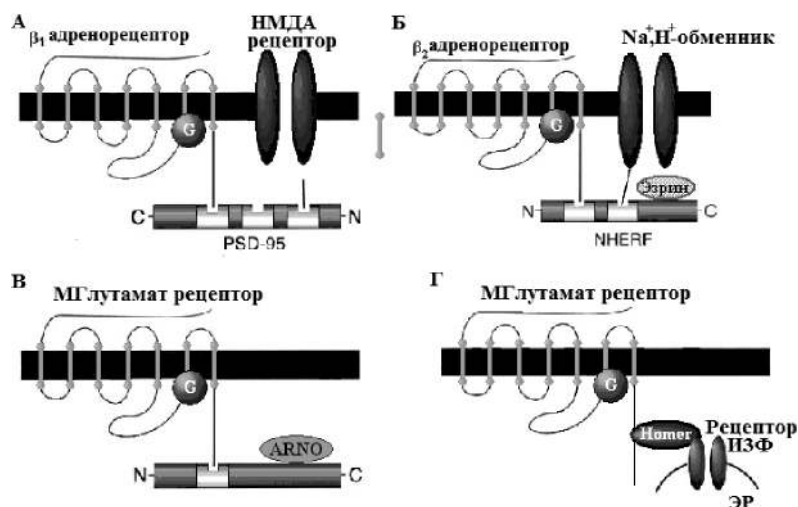


Рис. 2. Схематическое представление механизма сигнальной трансдукции. Связывание биологически активных лигандов с рецепторами вызывают изменение ферментативной активности рецептора и модифицируют ассоциацию рецептора с внутриклеточными медиаторами или локализацию и функцию самих медиаторов. Медиаторы могут вторично изменять активность «эффекторных» ферментов. Некоторые «эффекторы» могут перемещаться в ядро и контролировать экспрессию генов или принуждать к этому другие белки. Другие мишени — малые молекулы, которые генерируют дальнейшую передачу сигнальных медиаторов (вторичных мессенджеров) или контролируют метаболическое состояние клетки. Сигнальные пути могут охватывать целые классы таких молекул или могут включать несколько компонентов одного или более классов, и функционировать как последовательно, так и параллельно [27]. Темные квадратики показывают общие компоненты сигнального пути; белые — показывают специфические примеры.

ментов и играют важную роль в клеточной сигнализации: служат в качестве структурного (цитоскелетного, «костевого») материала и осуществляют прием различных сигналов путем связывания с различными партнерами. Платформенные белки контролируют олигомеризацию образующегося комплекса, доставляют сигнальный комплекс в специфические компартменты, функционируют как сортировочные адапторы и регулируют совпадение с детектором для повышения специфичности сигнального ответа [13]. Белки платформы организуются в подвижный платформенный ансамбль смешивания и согласования (подгонки) взаимодействующих доменов структурных субъединиц сигналом с участием якорных белков к различным субклеточным компартментам. Образование супрамолекулярных белковых платформ имеет большое значение в координации межклеточного взаимодействия, например, в синапсах. Так, сигналосома в синапсах образуется из белков-платформы, например, PDZ-домен-содержащего белка, в частности, белка постсинаптического уплотнения (PSD)-95, со специфическим центром которого взаимодействует НМДА-рецептор (N-метил-D-аспаратат-рецептор) и далее с актином цитоскелета

(рис. 3). При этом НМДА-рецепторы, как и глутаматные рецепторы, способны перемещаться из синапса во внесинаптическую мембрану и обратно [18]. Эти рецепторы имеют высокую аффинность к эндогенному агонисту и связывают глутамат в более низких концентрациях, чем AMPA (рецептор  $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты) рецепторы, что делает их идеальным кандидатом на роль приемников в диффузной нейротрансдукции [31]. Построенный ансамбль, называемый НМДА-сигналосома (рис. 3), обычно находится в заякоренном состоянии в межклеточном контакте в синапсе (постсинаптическом уплотнении), обеспечивает передачу интенсивности стимула при высвобождении нейротрансмиттера из другой клетки. Предполагается, что сигнальные платформы присутствуют в клетке примерно в стехиометрических количествах и играют, в основном, каталитическую роль. При этом гиперэкспрессия сигнальных платформ должна оказывать незначительное влияние на трансдукцию [13], а ингибирование сигнальной передачи, связанное с гиперэкспрессией белка кандидата на роль платформы, может быть одним из критериев платформенных белков.



**Рис. 3.** Сигнаლოსомы, построенные с PDZ-домен, содержащие платформенные белки:  
 А — НМДА сигнаლოსома — мультивалентный комплекс PDZ-домена белка постсинаптического уплотнения (PSD)-95 связанного с  $\beta_1$ -адренергическим рецептором и ключевым эффектором, например, глутаматным рецепторным каналом НМДА-типа. Мыши, лишённые PSD95, обнаруживают нормальное образование кластеров НМДА рецепторов в синапсах, но нижестоящие сигнальные события, которые обычно сопровождают активацию этих рецепторов, серьезно нарушены. Это подчеркивает функцию MAGUK как мест пришвартовки (docking) нейротрансммиттеров, внутриклеточных сигнальных молекул (таких, как кальмодулинкиназа, цитоскелетных акцессорных белков (таких, как CRIPT (богатый цистеинами белок, взаимодействующий с PDZ 3)) и молекул клеточной адгезии (таких, как нейролигин);  
 Б — мульти-PDZ белок связанный с  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обменником и  $\beta_2$ -адренорецептором и актин-ассоциированным белком эзрином;  
 В — PDZ-содержащий белок тамалин может быть через различные субтипы метаболотропного глутаматного (МГлутамат) рецептора связан с фактором АДФ-рибозилирования (ARF) открывающим нуклеотидсвязывающий центр (ARNO);  
 Г — сигнаლოსома метаболотропного глутаматного рецептора, построенная с использованием в качестве белковой платформы белок Homer связанного с рецептором инозитол-1,4,5-трифосфатом (ПИЗФ), обнаруженная в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР).

## Сигнаლოსома и инфламмосома.

### Сигнаლოსомы и адаптация иммунной системы к внешнему стрессорному воздействию

Образование мультидоменных комплексов играет важную роль в поддержании баланса каскадов сигнальной трансдукции в функционировании иммунной системы для адекватного защитного ответа клеток иммунной системы на воздействие патогенами [12, 29]. Индукторами иммуногенного внутриклеточного сигнального каскада, приводящего к индукции генов антимикробной защиты и продукции провоспалительных цитокинов, считаются рецепторы системы врожденного иммунитета (суперсемейства рецепторов интерлейкина-1/Toll-подобных рецепторов<sup>5</sup>), распознающих широкий спектр

патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП), в том числе основополагающих структурно-молекулярных компонентов врожденной системы неспецифической защиты, образраспознающих рецепторов (PRR). PRR являются рецепторами эндогенных опасных сигналов, гемодинамических сдвигов при сепсисе (гипоперфузии тканей и ишемически/реперфузионного феномена). Эффекты Toll-подобных рецепторов (TLR) опосредуются сетью молекул внутриклеточного сигналинга, которые передают сигнал с клеточной поверхности в ядро и активируют гены иммунного ответа (рис. 4). Одни и те же сигнальные системы, могут быть причиной развития иммунодефицита, системного воспаления, коагуляции, поражения тканей в органах мишенях при сепсисе. Например, белки теплового шока, фибриноген, фибронектин, гиалуран, бигликаны и белки с высококомобильной box-1 (HMGB-1) идентифируются, как опасные (токсичные) молекулярные паттерны (ТАМП), часто ассоциированные с сепсисом. После связывания с лигандом Toll-подобные рецепторы димеризуются, и возникающие при этом конформационные изменения привлекают к цитоплазматической части рецептора (TIR-домену) адапторные белки, содержащие TIR-домен. Формируется сигнальный комплекс (сигнаლოსома), состоящий из цитоплазматической части рецептора и одного из четырёх содержащих TIR-домен адапторных белков: MyD88, TIRAP/Mal, Trif/Ticam и

<sup>5</sup> Toll в переводе с немецкого означает «безумный», «изумительный», «несуразный», «ошеломительный», «паразитный», «удивительный») гена и кодируемого им белка. TLR относится к большому суперсемейству трансмембранных сигнальных PRR I типа — рецепторов ИЛ-1. Внеклеточный варибельный N-терминальный домен TLR содержит повторяющиеся олигопептидные фрагменты с высоким содержанием лейциновых повторов (leucine-rich repeats — LRR), которые являются структурно-молекулярной основой его способности взаимодействовать с лигандами. Расположенный с внутренней стороны клеточной мембраны цитозольный C-терминальный домен содержит структурно высококонсервативную последовательность из примерно из 200 аминокислотных остатков, гомологичную рецептору ИЛ-1 $\beta$ , в связи с чем получившую название Toll-интерлейкин-1 рецептор (TIR) [29].

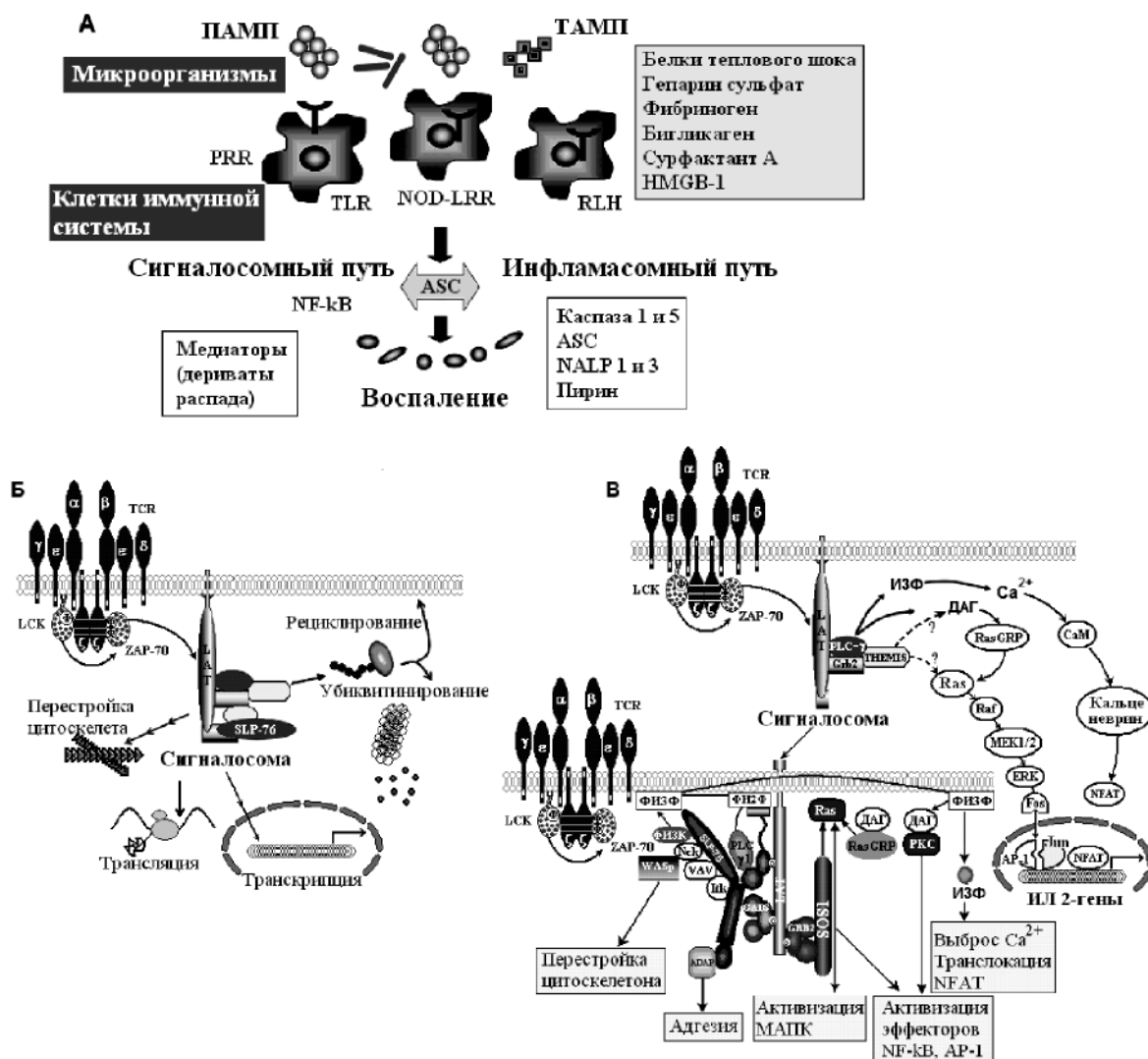
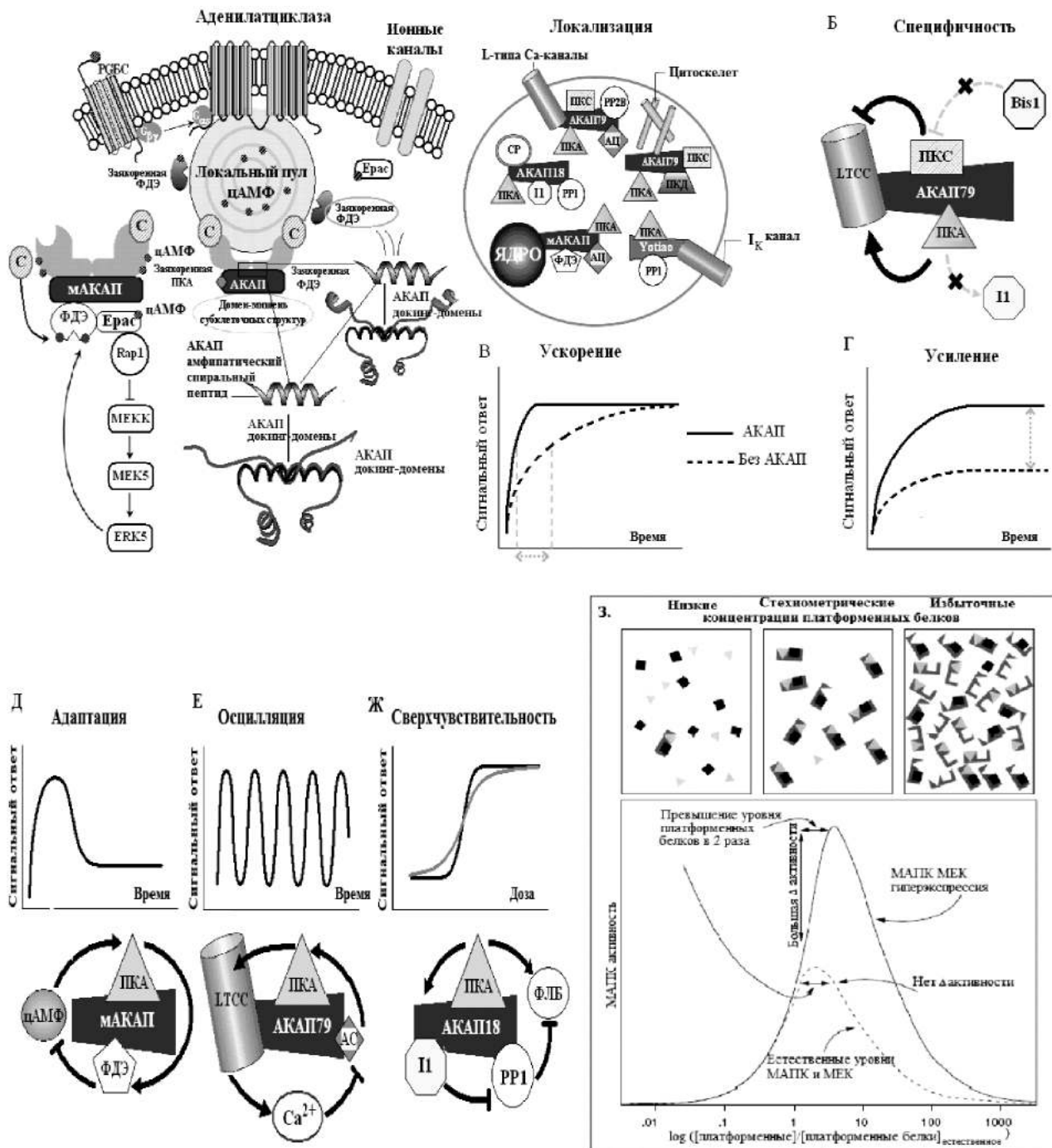


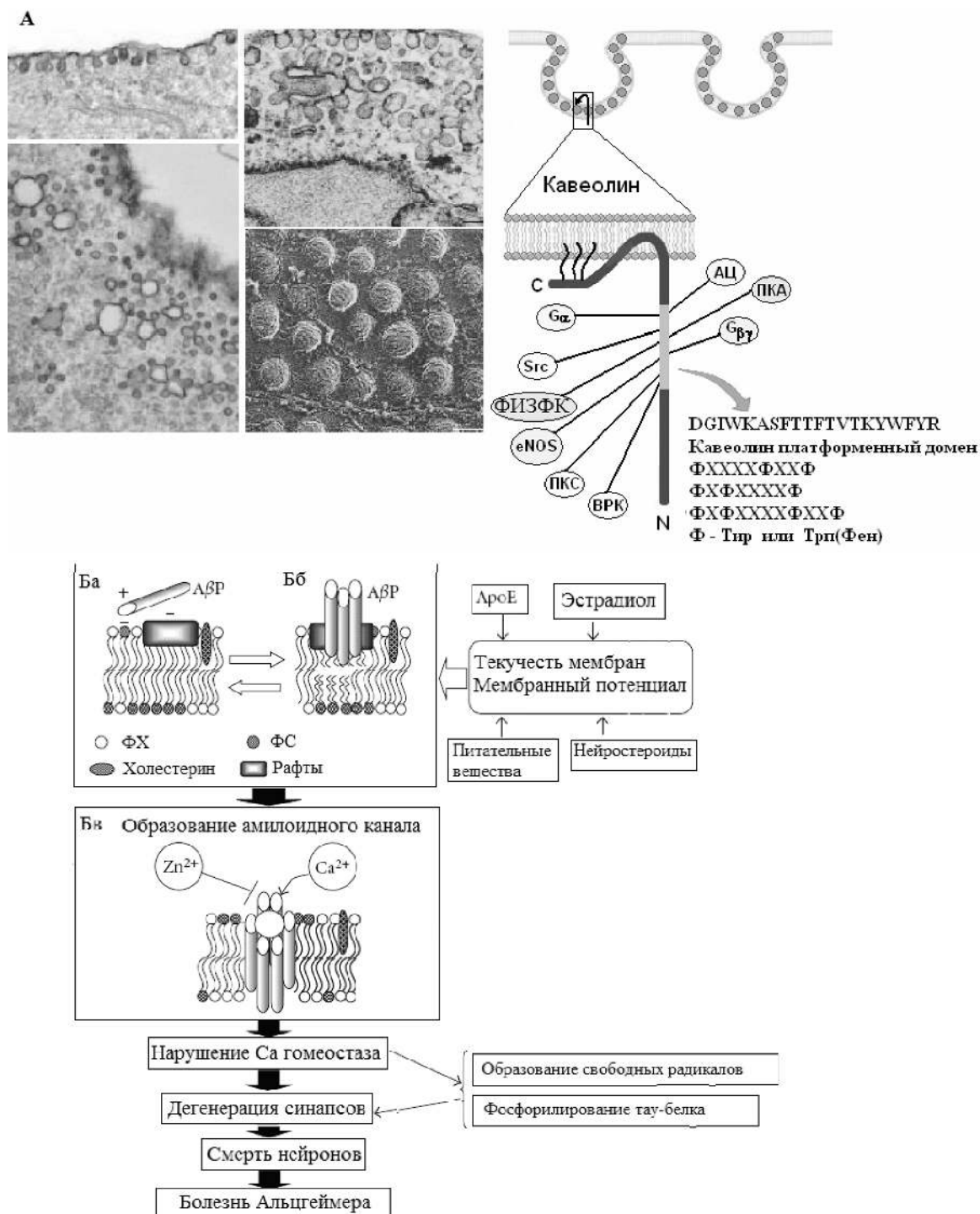
Рис. 4. Специфический иммунный ответ на различные патогены, медируемый различными молекулярными паттернами (ПАМП) и рецепторами детекторами паттернов (А) и индуцируемая рецептором Т-лимфоцитов активация сигнальных путей защитного ответа иммунной системы, как по пути стимулирования, прямой или непрямой активации фосфорилирования тирозиновых остатков показанная с использованием техники оценки количественной протеомики (стойкого изотопного меченя аминокислотных остатков в культуре клеток (SILAC)) (Б). Моделирование перехода сигналомсы в активную форму в результате фосфорилирования тирозиновых остатков белка THEMIS (timoцит-экспрессируемая сигнальная молекула, играющая важную роль на этапе их формирования) в сигнальном каскаде с последующим его рекрутированием в плазматическую мембрану и взаимодействием с фосфолипазой с дапторным белком LAT (регулятор активности Т-клеток (linker for activation of T-cell), скорее всего, через via Grb2 (В). THEMIS выступает в качестве позитивного регуляторного эффекта активации внеклеточной регулируемой киназы путем прямого или опосредованного воздействия на Ras (обладает собственной ГТФ-азной активностью и быстро отцепляет третий фосфат, чем возвращает себя в неактивное состояние самоинактивируется) [15].

TRAM [76]. Изменение любого из этих сайтов приводит к значительной редукции активности основных мишеней сигналинга — транскрипционных факторов: ядерного транскрипционного фактора каппаВ (NF-κB), белкового активатора (AP-1) и отвечающего на интерферон фактора (IRF)-3 и 5, или интерферон регулирующего фактора (IFN) и интенсивности иммунного ответа [8]. Полиморфизм высококонсервативных сайтов не только рецепторов, но и вспомогательных компонентов сигнальных комплексов влияет на эффективность их

взаимодействия и иммунной защиты, в целом [56]. Избирательное использование различных адапторных молекул объясняет различные иммунные ответы, активированные различными лигандами Toll-подобного рецептора. Изучение этого механизма может сделать адапторные молекулы мишенью новой терапевтической стратегии против тяжелого сепсиса [21, 28]. Toll-подобные рецепторы индуцируют продукцию про-Ил-1β и образование в ответ на продукты жизнедеятельности бактерий и продукты, выделяемые пораженными клет-



**Рис. 5.** Основные принципы АКАП сигнального механизма:  
 А – различные компартиментализованные сигнальные платформы АКАП в клетке;  
 Б – АКАП может осуществлять предшествующее взаимодействие на платформе [39];  
 В – АКАП может повышать скорость трансдукции сигнала;  
 Г – АКАП может повышать величину сигнала ответа. Примеры ответов сигнальных комплексов и соответствующих рабочих мотивов расположенных с АКАП;  
 Д – негативная петля через ФДЭ вовлечена в адаптацию сигнала [26];  
 Е – кальцевая обратная связь со значительной отсрочкой can create осцилляцию PKA активности;  
 Ж – двойное действие PKA на фосфорилирование фосфоламбана (ФЛБ) и ингибитор фосфатаз-1 (PPI), в обоих случаях приводящее к повышению коэффициента Хила;  
 З – модель функционирования сигнальной платформы митогенактивируемой протеинкиназы (МАПК)-митоген-активируемой внутриклеточной регулируемой киназы (МЕК) [13].



**Рис. 6.** Детальная организация липидных «плотиков» и кавеол в мембранах:

**А** — электронно-микроскопические и криоэлектронные снимки кавеол адипоцитов и кавеолин платформенный домен [21, 33, 34, 51]. Кавеола: жидкостно-упорядоченная и неупорядоченная фазы. При интеграции белка кавеолина-1, жидкостно-упорядоченные домены образуют малые приобретающие форму впячивания разрастания клеточной стенки в сторону цитоплазмы. Ансамбли мономеров кавеолина образуют дискретные гомоолигомеры (например, димеры), содержащие 14-16 молекул кавеолина;

**Б** — липидные «плотиков»: жидкая упорядоченная фаза обогащенная холестерином и экзоплазматическими сфинголипидами, фосфатидилхолином (ФХ), фосфатидилэтаноламином и фосфатидилсеринем (ФС), принимает участие в нейропротекции в ассоциации с белковой платформой (кавеолин-1 и потенциал-зависимые ионные (VDAC)) сконцентрированной в нейрональных микродоменах липидных «плотиков» [24, 34, 53, 55]. ApoE — фракция липидов мембран, AβP — β-амилоидный пептид.

ками, первичного мультибелкового комплекса, содержащего нуклеотид олигомеризующий домен (NOD)-подобные рецепторы (NLR), названного инфламасомой [12, 20, 46]. Это ведет к активации каспазы 1 и последующему процессингу активной внеклеточной формы интерлейкина (ИЛ)-1 $\beta$ . При этом посттрансляционная активация каспазы полностью регулируется инфламасомой, известными компонентами которой являются каспаза-1, speck-подобный белок (ASC), ассоциированный с апоптозом и содержащий домен активации и рекрутирования каспаз, семейство белков с нуклеотид олигомеризующим доменом (NOD)-подобных рецепторов (NALP-1 и домен, содержащий пирин) и каспазу 5 [29]. Кроме того, может образовываться альтернативная инфламасома, сконструированная из пирина, NALP-3 и других белков семейства NOD-LRR [10]. Инфламасомы, включающие ASC, которые являются триггерами активации каспазы-1 и процессинга ИЛ-1 $\beta$ , могут также регулировать активность NF- $\kappa$ B (рис. 4), что сопрягает функционирование инфламасомы с сигналом [29].

#### **Белки с доменом мультицентрового взаимодействия в структуре сигнасомы**

В ряде исследований показано, что белки сигнальной платформы могут иметь в структуре домен с мультицентрами взаимодействия с другими соединениями или *мотив* [12]. Например, гомологичные индивидуальные мотивы взаимодействия были обнаружены в платформах сигнальных белков, взаимодействующих с якорными белками цитоскелета и центрами мембран, по-разному активируемых агонистами  $\beta$ -адренергических рецепторов ( $\beta$ -АР) и простаноидами, так называемые АКАП (якорные белки А-киназы), которые имеют в структуре короткий пептидный мотив для связывания регуляторной субъединицы ПКА (наиболее частый партнер) и других партнеров (фосфатаз) одновременно с выделением сигнального нанодомена — сигнасомы [13, 25, 26, 32] (рис. 5). В зависимости от того, какие белки образуются в сигналосому, АКАП способна повышать сигнальную трансдукцию в пределах платформы с минимизацией распространения вне платформы, обеспечивая специфичность ответа. При этом АКАП может выступать не только как непосредственный переносчик сигнала, но и как платформа, модулирующая образование, локализацию, специфичность, распространение и усиление сигнала третичными специфическими молекулярными комплексами, связанными с мембраной клетки (рис. 5). Хотя домен-мишень (*target-domen*) в АКАП пока не установлен, эффективная АКАП-таргетная терапия различных тканей будет зависеть от субклеточно-молекулярной специфичности разработанного средства в пределах клетки. Целенаправленное воздействие на специфические внутриклеточные компартменты

позволит модулировать сигнальную трансдукцию в зависимости от структуры-локализации. Со-локализация АКАП и ПКА с Ca<sup>2+</sup>-каналами является необходимой для катехоламиновой активации каналов и проявления инотропизма [49]. Для мышечных клеток характерно присутствие мАКАП, которые образуют платформы для многих сигналов, включающих ПКА, аденилатциклазы (АЦ)-5, фосфодиэстеразы (ФДЭ), и таким образом регулируют уровень локального цАМФ, предотвращают сверхактивацию ПКА [41]. АКАП, локализуемая мАКАП сигналосому в цитоскелете, участвует в процессах миграции клетки, изменении градиента активности ПКА в плазматической мембране и модуляции гипертрофии сердца [16, 39, 56].

#### **Сигнасома в регуляции гипоксии**

Образование внутриклеточных ориентированных комплексов с мАКАП играет важную роль в регуляции индуцированного гипоксией фактора (HIF)-1 $\alpha$ <sup>6</sup> [2]. Так было показано, что мАКАП организует убикинон E3 лигазы, которые поддерживают стабильность HIF-1 $\alpha$  в оптимальном для его функции положении в центре ядра [56, 65]. Вымывание мАКАП из клетки, кардиомиоцитов например, или нарушение взаимодействия мАКАП с мишенью в перинуклеарной области изменяет стабильность HIF-1 $\alpha$  и транскрипцию генов, ассоциированных с гипоксией [24, 25, 64]. Компартментализация сигнальных компонентов, чувствительных к кислороду, может оказывать влияние на точность и величину гипоксического ответа и достигается в результате ассоциации мультибелкового сигнального комплекса регуляторного фактора HIF-1 $\alpha$  с АКАП, рассматриваемой в качестве кандидата на роль платформенного белка в организации комплекса HIF-1 $\alpha$  и связанных с ним регуляторных факторов. Показана взаимосвязь между сигнальными путями гипоксии и гипертрофии миокарда, возможным связующим звеном которых служит мАКАП: содержание мАКАП постоянно нарастает в ответ на гипертрофический стимул [64] с одной стороны, а с другой, мАКАП заякоривает 2 фермента, фактора обмена гуаниновых нуклеотидов, отвечающий на уровень цАМФ (Ерас-1) и модулирующий гипертрофический ответ и стабильность HIF-1 $\alpha$ . В условиях нормоксии в результате убиквитин-медируемой протеосомной деградации содержание HIF-1 $\alpha$  (время полужизни 5 мин) поддерживается на низком уровне. При снижении уровня кислорода происходит аккумуляция HIF-1 $\alpha$  в цитозоле, транслокация HIF-1 $\alpha$  в ядро с образованием

<sup>6</sup> HIF-1 $\alpha$  — транскрипционный фактор, регулирующий ответ клеток на снижение уровня кислорода, представляющий собой гетеродимерный белок, состоящий из HIF-1 $\alpha$  и -1 $\beta$ , мРНК которых экспрессируется при гипоксии [65].



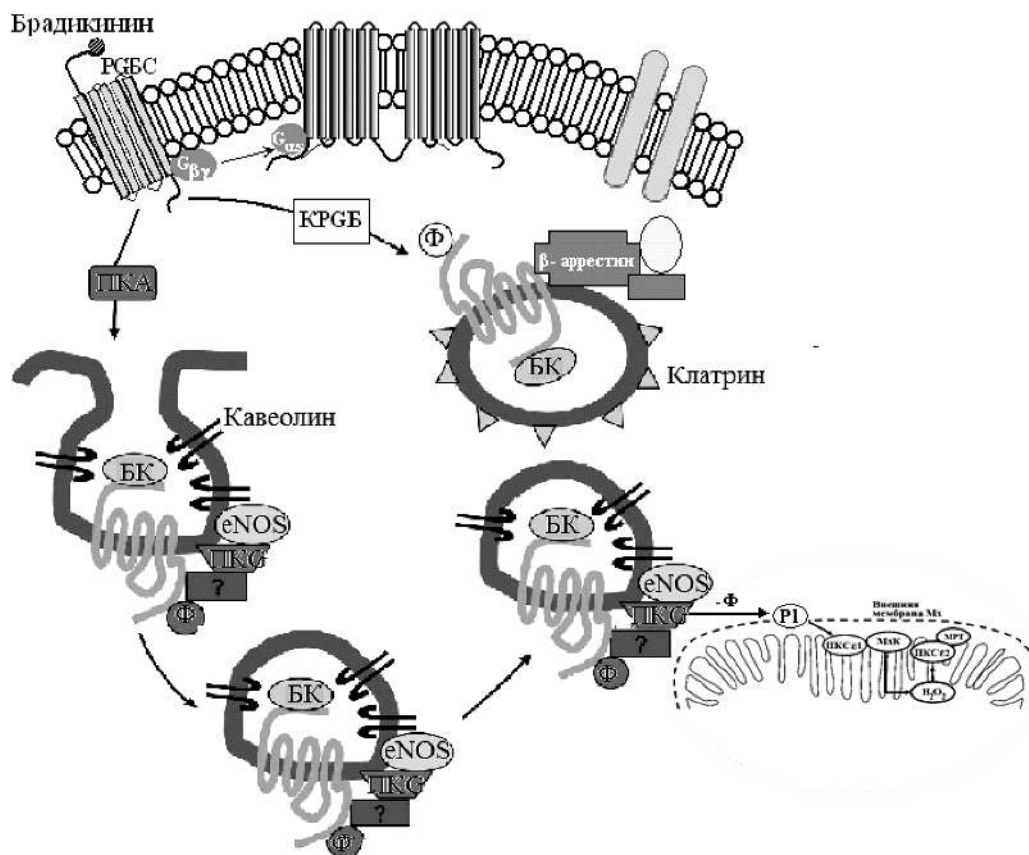


Рис. 7. Сигналосома, включающая брадикинин, содержащая фермент и сигнальный путь миграции сигнала к митохондри и индукции открытия митохондриального  $K^+$ АТФ канала (брадикинин со своим рецептором индуцирует образование ансамбля с эндотелиальной NO-синтазой и протеинкиназой G (ПКК) в кавеолярной (кавеолин 3) сигнальной платформе [38, 51].

гетеродимерного комплекса с HIF-1 $\beta$  субъединицей и активацией процессов транскрипции проангиогенных, метаболотропных и антиапоптотических генов [64]. Поскольку кардиомиоциты настроены на очень тонкую адаптацию к изменению уровня  $pO_2$ , раннее накопление HIF-1 $\alpha$  рассматривается в качестве маркера острого инфаркта миокарда, и компенсаторное быстрое повышение ритма сердечной деятельности в ответ на симпатические и парасимпатические нервные импульсы.

### Сигнасосомы и кавеолы

Участками сборки сигнальных комплексов, включающих рецепторы, эффекторы и внутриклеточные мишени для генерируемых вторичных посредников могут быть специализированные участки плазматической мембраны, называемые кавеолами. Кавеолы или пузырьки плазматической мембраны представляют собой не покрытые клатрином впячивания плазматической мембраны, размером 50—100 нм, богатые холестерином, сфинголипидами и белками кавеолинами [1] (рис. 7). Основным компонентом оболочки кавеол является интегральный мембранный белок кавеолин (мол. масса 21 кДа)

[6]. Обнаружено, что в кавеолах в больших количествах представлены самые различные компоненты сигнальных путей: рецептор инозитол-1,4,5-трифосфата (ИЗФ), рецепторы, связанные с G-белками, различные гетеротримерные G-белки, нерцепторные тирозинкиназы семейства Src,  $Ca^{2+}$ -АТФаза, Ras белки, рецепторы с собственной тирозинкиназной активностью, NO-синтаза, ПКК, изоформы ПКК и транспортеры типа, например,  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазы [14]. Сюрпризом оказалось то, что в кавеолярных мембранных структурах сигнальные молекулы находятся в концентрациях, во много раз превышающих их содержание в свободной плазматической мембране. Эти наблюдения легли в основу принятой сегодня «кавеолярно/плотиковой(рафтовой)» сигнальной гипотезы, объясняющей механизм регуляции последовательности сигнальных событий и *cross-talk* между различными сигнальными путями как результат компартиментализации сигнальных молекул в клеточных компартаментах (рис. 1). При этом образование супрамолекулярных комплексов с кавеолинами регулируют и изменяют активность многих из перечисленных белков [14, 27, 38]. Кавеолярные ансамбли сигнальной платформы могут сворачиваться и интернализироваться

[33]. Показано, например, что рецептор-специфическая сигнальная платформа  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы собирается в кавеоле, и под воздействием сердечного гликозида может отделяться и интернализироваться как сигналосома, осуществляя тем самым перенос сердечного гликозида внутрь клетки [14, 51]. Предполагается, что взаимодействие брадикинина с его рецептором ( $\text{Brk2}$ ) в миокарде также индуцирует образование везикулярной кавеолярной сигнальной платформы (сигнаლოსомы), которая фосфорилирует рецептор ( $\text{R1}$ ) на внешней мембране  $\text{Mx}$  (идентичность не установлена) — сигнаლოსомная гипотеза работы брадикининового рецептора. Сигнаლოსома брадикининового рецептора, состоит из кавеолина, эндотелиальной  $\text{NO}$ -синтазы ( $\text{eNOS}$ ), и ПКГ вблизи  $\text{Mx}$ . Терминальная киназа брадикининовой сигнаლოსомы ПКГ, фосфорилирует рецептор  $\text{R1}$  по серин/треониновому остатку в мембране  $\text{Mx}$ , в отличие от сигнаლოსомы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, где концевой киназой является ПККА [51]. ПКГ локализована в  $\text{Mx}$  и в отсутствие активации брадикининового рецептора, тогда как брадикининовый рецептор, кавеолин и  $\text{eNOS}$  встраиваются в сигнаლოსому только при стимуляции брадикининового рецептора. Добавление данной сигнаლოსомы к  $\text{Mx}$  сердца без прекондиционирования ведет к активации мито $\text{K}^+$  $_{\text{АТР}}$ -каналов и блокируется бафиломицином или метил- $\beta$ -циклодекстрином, что подтверждает роль эндосомальных и кавеолиновых сигнальных каскадов в процессах кондиционирования [48]. После фосфорилирования рецептора во внешней мембране  $\text{Mx}$  сигнал передается внутрь структуры и активирует ПКС $\epsilon$ 1 на внутренней стороне мембраны, а ввиду ее сопряженно-

сти в расположении с  $\text{K}^+$  $_{\text{АТР}}$ -каналами вызывает их открытие и в результате каскадных механизмов приводит к увеличению продукции  $\text{H}_2\text{O}_2$ .  $\text{H}_2\text{O}_2$ , в свою очередь, вторично активирует ПКС- $\epsilon$ 1 с последующим ингибированием некротических изменений в результате ингибирования митохондриальных пор ( $\text{MPT}$ ).

Показано, что важную роль в обеспечении структурно-функциональной организации кавеол играют липидные «плотики» («рафты») [23, 47, 53, 57]. При этом липидные микродомены участвуют в процессах передачи сигналов и в клетках, в которых кавеолы отсутствуют ( $\text{T}$ -лимфоциты, базофилы). Оказалось, что определенные участки мембраны самоорганизованы в обогащенные холестерином «плотики», более плотные, чем остальные области мембраны, и потому свободно дрейфующие в окружающем пространстве. В зависимости от происходящих в жизни клетки событий эти «плотики» способны собираться в большие платформы, и тогда молекулы белков, которые до того находились на разных «плотиках», получают возможность встретиться и провзаимодействовать [57]. Однако некоторые белки, как оказалось, вообще не способны попасть на «плотики», и, чтобы эти белки могли прореагировать с «постояльцами плотов», клетка разрушает часть липидных «плотиков», и «постояльцы» оказываются выброшенными навстречу новым событиям. Локализация сигнальных белков в различных субклеточных областях, таких как внутренняя мембрана и мембранное микроокружение (включая липидные «плотики») модулирует прием сигнала, и таким образом участвовать в развитии множества различных физиологических ответов

Таблица

Некоторые примеры клетка-специфических  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнальных сигнаლოსом

Структуры	Скелетная мышца	Сердце предсердие	Нейрон	T-клетка
Рецепторы		$\alpha_1\text{P}$ ЭТ-1 РАГП	$\text{P1m}$ Глу M1	TCP
Фосфолипаза C		ФЛС $\beta$	ФЛС $\beta$	ФЛС $\gamma$ 1
Каналы входа	$\text{Ca}_{v1.1}$	$\text{Ca}_{v1.2}$	$\text{Ca}_{v1.2}/\text{Ca}_{v2.1}$ $\text{Ca}_{v2.2}/\text{PHMДА}$	
Каналы выходы	$\text{R}_1\text{YR}$	$\text{R}_2\text{YR}$ $\text{P}_2\text{ИЗФ}$	$\text{R}_2\text{YR}$ $\text{P}_2\text{ИЗФ}$	$\text{P}_1\text{ИЗФ}$
Са-АТФаза плазматической мембраны (ПМСА)	ПМСА 1a, 1c, 1d	ПМСА 1c, 1d, 2a	ПМСА 2a, 3a	ПМСА 4b
Са-АТФаза CP (SERCA)	SERCA 1a, 1b	SERCA 2a	SERCA 2b, 3	SERCA 2b, 3
Na-Са-обменник	Na-Са-обменник	Na-Са-обменник 1	Na-Са-обменник 1,3	—
Буферы	Парвальбумин	Парвальбумин	Парвальбумин Калбиндин 28K	
Сенсоры	Тропонин + Кальмодулин	Тропонин + Кальмодулин	Кальмодулин	Кальмодулин

на активацию внеклеточными стимулами, в частности, в обеспечении нейро- и кардиопротекции [33, 34, 45, 60].

### Сигнасомы с кавеоллярными структурами и/или липидными плотиками

Сигнасомная структура, участвующая в механизме нарушения нейропротекции при болезни Альцгеймера была открыта учеными из Дрезденского института молекулярной клеточной биологии и генетики им. Макса Планка [44, 45]. Было показано, что она состоит из эстрогенного рецептора в ассоциации с белковой платформой (кавеолин-1 и потенциал-зависимые ионные VDAC)) [22]. VDAC обычно сконцентрированы в нейрональных микродоменах липидных «плотиков», где была показана их способность взаимодействовать с эстрогеновыми рецепторами с образованием части макромолекулярного комплекса, который вместе с кавеолином 1 и другими сигнальными белками образует сигнасому [23]. В данной сигнасоме эстрогенный рецептор оказывает нейропротекторный эффект через модуляцию активации VDAC, тем самым восстанавливая, нарушенное при болезни Альцгеймера взаимодействие эстрогенного рецептора и VDAC в липидных «плотиках» — явления, лежащего в основе улучшения функции нейронов. Изменения в образовании и конформационном состоянии  $\beta$ -амилоидного белка, компонента внеклеточных бляшек в мозге у пациентов с болезнью Альцгеймера. Описанные механизмы патогенеза рассматриваются в качестве альтернативного механизма функционирования эстрогенового рецептора и играют важную роль в механизме нейропротекции при болезни Альцгеймера. При этом липидные плотики выступают в качестве естественных платформ для олигомеров  $\beta$ -амилоидного белка, образование которых связано с развитием нейротоксичности [6, 19]. Природа патогенетических свойств агрегатов важна для идентификации правильных мишеней при разработке эффективных лекарственных препаратов.

### Са-сигнасома

В исследованиях транскрипции генов, кодирующих переносчики кальция в плазматической (PMCA и  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -обменник) и внутриклеточной мембранах (рецептор ИЗФ), показано, что  $\text{Ca}^{2+}$  как сигнальная молекула обладает авторегулирующими свойствами [19]. В мозжечковых нейронах синтезируются четыре основных изоформы насоса PMCA, три основных изоформы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -обменника, и рецептор ИЗФ типа 1. Каждый тип клеток имеет строго определенный набор инструментов ( $\text{Ca}^{2+}$ -toolkit) для осуществления адекватного ответа на  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналы в пространстве и во времени, названный  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналь-

ной сигнасомой, генерируемой на уровне экспрессии в процессе развития [6, 19, 30]. Клеткоспецифичность  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнасомы обеспечивает быстрое высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  для активации сокращения скелетной и сердечной мышц, тогда как  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнасомы Т-клетки создают медленное повторяющееся высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  необходимое для пролиферации клетки (таблица).

Существует множество доказательств, что  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнасома может играть роль ключевого регулятора обратной связи между длительной активацией Са-сигнасомы и срывом адаптации, переключения  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнальных механизмов, а применение селективных ингибиторов Са-каналов позволяет повышать  $\rho\text{Ca}$  и устранять сдвиги в Са-сигнальных модулях [43].

### Заключение

Образование сигнасом является ключевым механизмом выделения сигнального белка в специфическом субклеточном окружении, обеспечивая тем самым, способность белка (фермента) находиться вблизи соответствующих мишеней действия и предотвращения беспорядочную активность белков (ферментов). Образование сигнасом важный механизм компартиментализации сигнальных путей в сложном в сложном механизме сигнальной трансдукции клетки и развитии порочных кругов поддержания и прогрессирования заболеваний. Белки, образующие платформы для построения сигнасом, выполняют важную регуляторную роль в различных сигнальных путях, хотя прямо не принимают участие в выполнении функции, они взаимодействуют и/или связываются с множеством сигнальных путей, организуя их в комплексы и тем самым регулируют передачу сигнала и помогают локализации компонентов (компартиментализации) данного пути в специальной области клетки, например, плазматической мембране, цитоплазме, или ядре, комплексе Гольджи, эндосоме, Мх. Это приводит к переходной, но благоприятной ориентации отдельных молекул в пределах комплекса, позволяя быстрое взаимодействие с дополнительными компонентами. С другой стороны, такая система должна определить свою стабильность (и поэтому свою целую жизнь), уравновешивая силы межмолекулярных взаимодействий в пределах комплекса, чтобы выполнить требование обратимости (т.е. способность быстро демонтировать). Переходные взаимодействия между сигнальными промежуточными звеньями и якорными комплексами (например, на мембране) предполагают более эффективное взаимодействие, чем просто преходящие взаимодействия в якорных комплексах [11]. Взаимодействие между «свободными» компонентами и комплексами часто бывает ответственным за переключение комплекса в активное состояние, и предполагает присутствие неактивированно-

го комплекса в состоянии предготовности, но без активации низходящего каскада событий. Такой конституционно «молчаливый» («silent») комплекс в поющих клетках наблюдается экспериментально на примере, МЕК-ERK комплекса [13] или актомиозин-АДФ-Ф комплекса с гликолитическими ферментами в покое в миофибриллах поперечно-полосатых мышц [3], и существующих для облегчения трансмиссии сигнала путем быстрой ассоциации компонент в один ансамбль, тем самым уменьшая реакционное пространство. Внутриклеточное пространство (мембраны, цитоплазмы, нуклеоплазмы) является средой с высоким уровнем молекулярной скученности, которая интерферирует со свободной диффузией и в присутствии ряда структурных барьеров, мембраны или нити актина и т.д., которые сами постоянно претерпевают изменения, отдаляют движение внутриклеточных структур от броуновского теплового движения. События осложняются мультидоменной природой сигнальных макромолекул, образующих мультимолекулярные комплексы, сигналосомы, которые являются высокоориентированными, несмотря на большую скученность во внутриклеточной среде. Все дифференцированные клетки имеют свои специфические сигналосомы, функционирование которых заключается в преобразовании входящего сигнала в ответную функцию. Состояние болезни развивается в результате ремоделирования сигналосомы, как фенотипического, так и генотипического, и таким образом участвовать в развитии множества различных физиологических ответов на активацию внеклеточными стимулами. Понимание патофизиологических механизмов формирования дефектов в сигналосоме и взаимосвязи между ремоделированием сигналосомы, ремоделированием внутриклеточных структур и миокарда, в целом, как и ремоделирование функционирования сигналосомы, позволит сделать существенный шаг вперед в создании и внедрении фармакологических средств таргетной терапии сердечно-сосудистых, нейродегенеративных заболеваний и устранении напряженности иммунной системы.

### Список литературы

1. **Воробьев Р.И., Шумахер Г.И., Хорева М.А.** и др. Роль кавеол и кавеолинов в норме и патологии // Кардиовас. терапия и профилактика. — 2008. — 7(8). — С. 105—111.
2. **Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.А., Сукоян Г.В.** Новые данные о сигнальных механизмах адаптации к гипоксии и их роль в системной регуляции // Патогенез. — 2011. — 3. — С. 4—14.
3. **Подлубная З.А., Цховребова Л.А., Сукоян Г.В.** и др. Взаимодействие альдолазы с тонкими нитями в составе I-дисков, изолированных из скелетных мышц // Цитология. — 1989. — 31(4). — С. 460—464.
4. **Сукоян Г.В.** Сигналосомы сердца, как терапевтические мишени при гипоксически-ишемически-реперфузионных поражениях миокарда // Патогенез. — 2011. — 3. — С. 64.
5. **Терентьев А.А., Молдогазиева Н.Т., Шайтан К.В.** Белок-белковые взаимодействия // Успехи биологической химии. — 2009. — 49. — С. 429—480.
6. **Adebisi A., Narayanan D., Jaggari J.H.** Caveolin-1 Assembles Type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and canonical transient receptor potential 3 channels into a functional signaling complex in arterial smooth muscle cells // J. Biol. Chem. — 2011. — Vol. 286. — P. 4341—4348.
7. **Ardehali H., Sabbah H.N., Burke M.A.** et al. Targeting myocardial substrate metabolism in heart failure: potential for new therapies // Eur. J. Heart. Fail. — 2012. — Vol. 14 (2). — P. 120—129.
8. **Balagopalan L., Coussens N.P., Sherman E.** et al. The LAT Story: A Tale of Cooperativity, Coordination, and Choreography // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. — 2010. — Vol. 2(8). — a005512 — a005512.
9. **Bhattacharyya R., Remenyi P., Yeh B.J., Lim W.A.** Domains, motifs, and scaffolds: the role of modular interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits // Annu. Rev. Biochem. — 2006. — Vol. 75. — P. 655—680.
10. **Bray D.** Signaling complexes: biophysical constraints on intracellular communication // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Structure. — 1998. — Vol. 27. — P. 59—75.
11. **Bray D.** The cell as a thermostat: how much does it know? in Advances in Systems Biology / Goryanin I.I., Goryachev A.B., eds. — Springer-Verlag, London // Advances in Experimental Medicine and Biology. — 2012. — Vol. 736. — P. 193—198.
12. **Brockmeyer C., Paster W., Pepper D.** et al. T Cell Receptor (TCR)-induced Tyrosine Phosphorylation Dynamics Identifies THEMIS as a New TCR Signalosome Component // J. Biol. Chem. — 2011. — Vol. 286 (9). — P. 7535—7547.
13. **Burack W.R., Shaw A.A.** Signal transduction: hanging on a scaffold // Current Opinion in Cell Biology. — 2000. — Vol. 12. — P. 211—216.
14. **Cai T., Wang H., Chen Y.** et al. Regulation of caveolin-1 membrane trafficking by the Na/K-ATPase // J. Cell. Biol. — 2008. — Vol. 182. — P. 1153—1169.
15. **Calebiro D., Nikolaev V.O., Lohse M.J.** Signaling by internalized G-protein-coupled receptors // Trends Pharmacol. Sci. — 2010. — Vol. 31. — P. 221—228.
16. **Carnegie G.K., Soughayer J., Smith F.D.** et al. A-Kinase Anchoring Proteins That Regulate Cardiac Remodeling // Cardiovasc. Pharmacol. — 2011. — Vol. 58(5). — P. 451—458.
17. **Cebecauer M., Spitaler M., Serge A., Magee A.I.** Signaling complexes and clusters: functional advantages and methodological hurdles // J. Cell. Sci. — 2010. — Vol. 123(Pt 3). — P. 309—320.
18. **Chen X., Nelson C., Li X.** et al. PSD-95 is required to sustain the molecular organization of the postsynaptic density // J. Neurosci. — 2011. — Vol. 31(17). — P. 6329—6338.
19. **Cheng H., Wei S., Wei L., Verkhratsky A.** Calcium signaling in physiology and pathophysiology // Acta Pharmacol. Sin. — 2006. — Vol. 27(7). — P. 767—772.
20. **Chidlow J.H., Sessa W.C.** Caveolae, caveolins, and caveins: complex control of cellular signalling and inflammation // Cardiovascular Research. — 2010. — Vol. 86. — P. 219—225.
21. **Coggins M., Rosenzweig A.** The Fire Within: Cardiac Inflammatory Signaling in Health and Disease // Circ. Res. — 2012. — Vol. 110. — P. 116—125.
22. **Dai S., Hall D.D., Hell J.W.** Supramolecular Assemblies and Localized Regulation of Voltage-Gated Ion Channels // Physiol. Rev. — 2009. — Vol. 89(2). — P. 411—452.
23. **Das M., Das D.K.** Lipid Raft in Cardiac Health and Disease // Curr. Cardiol. Rev. — 2009. — Vol. 5(2). — P. 105—111.
24. **Dodge-Kafka K.L., Bauman A., Kapiloff M.S.** A-kinase anchoring proteins as the basis for cAMP signaling // Handb. Exp. Pharmacol. — 2008. — (186). — P. 3—14.
25. **Dodge-Kafka K.L., Soughayer J., Pare C.G.** et al. The protein kinase A anchoring protein mAKAP co-ordina-

- tes two cAMP effector pathway // *Nature*. — 2005. — Vol. 437. — P. 574–578.
26. **Downard J.** The ins and outs of signaling // *Nature*. — 2001. — Vol. 411. — P. 759–762.
27. **Jordan J.D., Landau E.M., Iyengar R.** Signaling networks: the origins of cellular multitasking // *Cell*. — 2000. — Vol. 103(2). — P. 193–200.
28. **Ferrao R., Li J., Bergamin E., Wu H.** Structural Insights into the Assembly of Large Oligomeric Signalosomes in the Toll-Like Receptor-Interleukin-1 Receptor Superfamily // *Sci. Signal*. — 2012. — 5. — re3.
29. **Gold M.G., Stengel F., Nygren P.J.** et al. Architecture and dynamics of an A-kinase anchoring protein 79 (AKAP79) signaling complex // *PNAS*. — 2011. — Vol. 108(16). — P. 6426–6431.
30. **Gonzalez A., Ravassa S., Beaumont J.** et al. New targets to treat the structural remodeling of the myocardium // *J. Am. Coll. Cardiol*. — 2011. — Vol. 58(18). — P. 1833–1843.
31. **Good M.C., Zalatan J.G., Lim W.A.** Scaffold Proteins: Hubs for Controlling the Flow of Cellular Information // *Science*. — 2011. — Vol. 332. — P. 680–686.
32. **Greenwald E.C., Saucerman J.J.** Bigger, better, faster: principles and models of AKAP signaling // *J. Cardiovasc. Pharmacol*. — 2011. — Vol. 58(5). — P. 462–469.
33. **Harvey R.D., Calaghan S.C.** Caveolae create local signalling domains through their distinct protein content, lipid profile and morphology // *J. Mol. Cell. Cardiol*. — 2012. — Vol. 52(1). — P. 366–375.
34. **Horikawa Y.T., Panneerselvam M., Kawaraguchi Y.** et al. Cardiac-Specific Overexpression of Caveolin-3 Attenuates Cardiac Hypertrophy and Increases Natriuretic Peptide Expression and Signaling // *J. Am. Coll. Cardiol*. — 2011. — Vol. 57. — P. 2273–2283.
35. **Houslay M.D.** Underpinning compartmentalized cAMP signaling through targeted cAMP breakdown // *Trends in Biochem. Science*. — 2009. — Vol. 30(10). — P. 1–10.
36. **How C.L.** Modeling the signaling endosome hypothesis: Why a drive to the nucleus is better than a (random) walk // *Theor. Biol. Med. Modeling*. — 2005. — Vol. 2. — P. 43–58.
37. **Iancu R.V., Ramamurthy G., Harvey R.D.** Spatial and temporal aspects of cAMP signaling in cardiac myocytes // *Proceedings of the Australian Physiological Society*. — 2008. — Vol. 39. — P. 31–37.
38. **Kang M., Chung K.Y., Walker J.W.** G-protein coupled receptor signaling in myocardium: not for the faint of heart // *Physiology (Bethesda)*. — 2007. — Vol. 22. — P. 174–184.
39. **Kapiloff M.S.** AKAPs: temporal and spatial regulation of intracellular signal transduction in the cardiovascular system // *J. Cardiovasc. Pharmacol*. — 2011. — Vol. 58. — P. 337–338.
40. **Kholodenko B.N.** Cell-signalling dynamics in time and space // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. — 2006. — Vol. 7. — P. 165–176.
41. **Kritzer M.D., Li J., Dodge-Kafka K., Kapiloff M.S.** AKAPs: The architectural underpinnings of local cAMP signaling // *J. Mol. Cell. Cardiol*. — 2012. — Vol. 52(2). — P. 351–358.
42. **Linderman J.J.** Modeling of G-protein coupled receptor signaling pathways // *J. Biol. Chem*. — 2009. — Vol. 284. — P. 5427–5431.
43. **Magno A.L., Ward B.K., Ratajczak T.** The calcium-sensing receptor: a molecular perspective // *Endocrine Rev*. — 2011. — Vol. 32(1). — P. 3–30.
44. **Marin R.** Signalosomes in the Brain: Relevance in the Development of Certain Neuropathologies Such as Alzheimer's Disease // *Front Physiol*. — 2011. — Vol. 2. — P. 23–29.
45. **Marin R., Marrero-Alonso J., Fernandez C., Cury D., Diaz M.** Estrogen receptors in lipid raft signalling complexes for neuroprotection // *Front. Biosci. (Elite Ed.)*. — 2012. — Vol. 4. — P. 1420–1433.
46. **Matthew C., Rosenzweig A.** The Fire Within: Cardiac Inflammatory Signaling in Health and Disease // *Circ. Res*. — 2012. — Vol. 110. — P. 116–125.
47. **Michel V., Bakovic M.** Lipids rafts in health and disease // *Biol. Cell*. — 2007. — Vol. 99. — P. 129–140.
48. **Murphy E., Wong R., Steenbergen C.** Signalosomes: delivering cardioprotective signals from GPCRs to mitochondria // *Am. J. Physiol*. — 2008. — Vol. 295. — H920–H922.
49. **Negro A., Dodge-Kafka K., Kapiloff M.S.** Signalosomes as therapeutic targets // *Prog. Pediatr. Cardiol*. — 2008. — Vol. 25(1). — P. 51–56.
50. **Ostrom F.S.** New determinants of receptor-effector coupling: trafficking and compartmentation in membrane microdomains // *Mol. Pharmacol*. — 2002. — Vol. 61(3). — P. 473–476.
51. **Quinlan C.L., Costa A.D.T., Costa C.L.** et al., Conditioning the Heart Induces Formation of Signalosomes that Interact with Mitochondria to Open MitoKATP // *Am. J. Physiol*. — 2008. — Vol. 295. — H953–H961.
52. **Pawson T., Scott J.D.** Signaling Through Scaffold, Anchoring, and Adaptor Proteins // *Science*. — 1997. — Vol. 278 (5346). — P. 2075–2080.
53. **Pristera A., Okuse K.** Building Excitable Membranes: Lipid Rafts and Multiple Controls on Trafficking of Electrogenic Molecules // *Neuroscientist*. — 2012. — Vol. 18. — P. 70–81.
54. **Sanderson J.L., Dell'Acqua M.L.** AKAP Signaling Complexes in Regulation of Excitatory Synaptic Plasticity // *Neuroscientist*. — 2011. — Vol. 17. — P. 321–336.
55. **Schengrund C.L.** Lipid rafts: keys to neurodegeneration // *Brain Res. Bull*. — 2010. — Vol. 82. — P. 7–17.
56. **Scott J.D., Santana L.F.** A-kinase anchoring proteins. Getting to the heart of the matter // *Circulation*. — 2010. — Vol. 121. — P. 1264–1271.
57. **Simons K., Gerl M.J.** Revitalizing membrane rafts: new tools and insights // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. — 2010. — Vol. 11(10). — P. 688–699.
58. **Singer S.J., Nicolson G.L.** The fluid mosaic model of the structure of cell membranes // *Science (Wash DC)*. — 1972. — Vol. 175. — P. 720–731.
59. **Stangherlin A., Zaccolo M.** Phosphodiesterases and subcellular compartmentalized cAMP signaling in the cardiovascular system // *Am. J. Physiol*. — 2012. — Vol. 302. — H379–H390.
60. **Tsutsumi Y.M., Horikawa Y.T., Jennigs M.M.** et al. Opioid-induced preconditioning is dependent on caveolin-3 expression // *Anesth. Analg*. — 2010. — Vol. 111(5). — P. 1117–1121.
61. **Verschuren J.J.W., Trompet St., Wessels J.A.M.** et al. First published online: July 30, 2011.
62. **Vondriska T.M., Pass J.M., Ping P.** Scaffold proteins and assembly of multiprotein signaling complexes // *J. Mol. Cell. Cardiol*. — 2004. — Vol. 37(2). — P. 391–397.
63. [European Heart Journal](http://EuropeanHeartJournal.oxfordjournals.org) [www.oxfordjournals.org](http://www.oxfordjournals.org)
64. **Wong W., Goehring A.S., Kapiloff M.S.** et al. mAKAP compartmentalizes oxygen-dependent control of HIF-1 $\alpha$  // *Sci. Signal*. — 2008. — Vol. 51(1). — P. 18.
65. **Zhang P., Mende U.E.** Regulators of G-Protein Signaling in the Heart and Their Potential as Therapeutic Targets // *Circ. Res*. — 2011. — Vol. 109. — P. 320–333.
66. **Zhou H.X., Rivas G., Minton A.P.** Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences // *Annu. Rev. Biophys.* — 2008. — Vol. 37. — P. 375–397.

Поступила 12.10.12

В.В. Семченко<sup>1</sup>, С.С. Степанов<sup>3</sup>, Н.Н. Боголепов<sup>2</sup>, С.И. Ерениев<sup>3</sup>

## Постишемическая реорганизация межнейронных синапсов неокортекса млекопитающих

<sup>1</sup> Институт ветеринарной медицины и биотехнологий ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина», 1644122, Омск, ул. Октябрьская, 92

<sup>2</sup> ФГБУ «Научный центр неврологии» Российской академии медицинских наук, 2105064, Москва, пер. Обуха, 5

<sup>3</sup> ФГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития РФ, 3644043, Омск, ул. Ленина, 12

*В работе анализируются структурно-функциональные механизмы постишемической реорганизации межнейронных синапсов неокортекса млекопитающих. Обсуждаются основные механизмы адаптации и восстановления межнейронных отношений (неосинаптогенез и различные типы реорганизации функционирующих синапсов). Подчеркивается существование общих механизмов и специфических особенностей реакции синапсов неокортекса на ишемию различного типа. Указывается, что функционально зрелая нейронная сеть обладает очень высоким адаптивным и репаративным потенциалом.*

**Ключевые слова:** неокортекс, синапсы, синаптоархитектоника, репарация, реорганизация

V.V. Semchenko<sup>1</sup>, S.S. Stepanov<sup>3</sup>, N.N. Bogolepov<sup>2</sup>, S.I. Ereniev<sup>3</sup>

## Postischemic reorganization of mammals neocortex interneural synapses

<sup>1</sup> Institute of Veterinary Medicine and Biotechnologies of the Omsk P.A. Stolypin State Agrarian University

<sup>2</sup> Scientific Centre of Neurology of the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

<sup>3</sup> Omsk State Medical Academy

*In work structurally functional mechanisms of postischemic reorganisation of mammals neocortex interneural synapses are analyzed. The basic mechanisms of adaptation and restoration of interneural relations (neo-synaptogenesis and various types of reorganisation functioning synapses) are discussed. Existence of the general mechanisms and specific features of neocortex synapses reaction on an ischemia is underlined. It is underlined, that functionally mature neural network possesses very high adaptive and reparative potential.*

**Key words:** neocortex, synapses, synaptoarchitectonic, reparation, reorganization

Изучение межнейронных взаимоотношений в норме и при патологических состояниях — актуальная проблема современной нейробиологии. В рамках этой проблемы химические синапсы рассматриваются как основные образования коммуникационной системы нейронов. С эволюцией синапсов связано появление высшей нервной деятельности и формирование известной модели нейронной суперсистемы головного мозга млекопитающих [10, 19, 22, 26, 34, 35].

В настоящее время накоплен огромный фактический материал о структурно-функциональной организации нейронов, дендритов и практически всех типов синапсов неокортекса [19, 35, 38, 39]. Успешно изучается молеку-

лярная организация синапсов [30, 39]. Раскрыты базовые механизмы интеграции нейронов, различных этапов неосинаптогенеза, развития и функционирования синапсов [15, 21, 36, 37]. Установлены сигнальные пути воздействия на эти процессы [13, 31], а также механизмы биоэнергетического и биосинтетического их обеспечения [16, 23]. Описаны механизмы межнейронного обмена макромолекулами [20, 33]. Интенсивно изучаются различные типы краткосрочной и долгосрочной синаптической пластичности, а также механизмы их регуляции и структурные проявления [9, 17, 24, 25]. Большое внимание уделяется изучению структурно-функциональных изменений межнейронных синапсов и их составляющих (пре-, постсинаптическая части, синаптическая щель, цитоскелет) при старении, различных воздействиях, патологических состояниях головного мозга экспериментальных животных, а также неврологических и психических заболеваний человека [9, 14, 28, 29, 32, 37, 38]. Нейронные сети головного мозга, функция которых зависит от межнейронных синапсов [12], должны иметь высокий

**Для корреспонденции:** Семченко Валерий Васильевич, д-р мед. наук, проф. каф. анатомии, гистологии, физиологии и патологической анатомии ИВМиБ ФГБОУ ВПО ОмГАУ им. П.А. Столыпина, науч. рук. гистологической лаборатории с электронной микроскопией ВНИИБТЖ Россельхозакадемии, рук. лаб. гипоксических повреждений мозга и нейрореабилитации Омского НИЦ СО РАМН. E-mail: ivm\_omgau\_gistology@mail.ru

потенциал сохранения структурного гомеостаза и восстановления межнейронных взаимоотношений. В этой связи одним из фундаментальных направлений нейроморфологии является изучение межнейронных синапсов неокортекса млекопитающих в постинфарктном периоде [1, 6]. Глубокое системное изучение реакции нейронов и межнейронных синапсов головного мозга на ишемию необходимо для теоретического обоснования использования различных методов его защиты в постинфарктном периоде [1, 5, 3, 27].

*Цель сообщения* — анализ собственных и литературных данных о структурно-функциональном состоянии межнейронных синапсов сенсомоторной коры большого мозга экспериментальных животных и человека после различных ишемических воздействий.

В собственных экспериментальных исследованиях использованы следующие модели ишемии на белых крысах ( $n=180$ ):

- 1) 10-минутное пережатие аорты;
- 2) 6-минутная полная асфиксия;
- 3) 20-минутное пережатие общих сонных артерий;
- 4) массивная кровопотеря из бедренной артерии.

Для данных моделей характерны выраженные вторичные нарушения микроциркуляции в постинфарктном периоде и диффузно-очаговые изменения головного мозга [5, 9]. Головной мозг фиксировали путем перфузии через восходящую часть дуги аорты смеси 4% раствора параформальдегида, 1% раствора глутарового альдегида и 5% раствора сахарозы на 0,1 М фосфатном буфере ( $pH = 7,4$ ) [9]. Материал для гистологического исследования забирала сразу после ишемического воздействия, через 30 и 90 мин, 6 ч, 1, 3, 7, 14, 30 и 60 сут. постинфарктного периода. Сенсомоторную кору (СМК) большого мозга контрастировали в 1%-ном водном растворе четырехоксида осмия, а также спиртовом растворе фосфорновольфрамовой кислоты (ФВК). ФВК детально выявляет элементы парамембранного цитоскелета синапсов (постсинаптическое уплотнение, плотные проекции пресинаптической части и содержимое синаптической щели) [7, 8, 9], что позволяет дополнительно верифицировать различные типы структурно-функционального состояния синапсов. Ультратонкие (70—100 нм) срезы осмированного материала дополнительно контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца.

На электронограммах нейропиля слоя I и III СМК оценивали общую численную плотность синапсов, содержание деструктивно измененных синапсов, форму и размеры активной зоны контактов, а также степень сложности пространственной организации синаптических устройств. Для этого определяли следующие морфометрические параметры:

- 1) количество функционально зрелых и незрелых контактов;
- 2) количество мелких, средних и крупных контактов;

3) площадь сечения пресинаптической терминали и постсинаптической зоны (шипика); 4) количество шпиков с шипиковым аппаратом;

5) размеры и форму шипикового аппарата;

6) длину активной зоны синапса;

7) толщину постсинаптического уплотнения;

8) размеры и форму плотных проекций пресинаптической зоны;

9) толщину пре- и постсинаптической мембраны;

10) ширину синаптической щели, размеры и распределение внутрищелевого вещества;

11) характер распределения и количество синаптических пузырьков в пресинаптической зоне;

12) число митохондрий в терминали;

13) размер митохондрий;

14) количество эндо-, экзоцитозных  $\Omega$ -профилей и мультивезикулярных тел;

15) конфигурацию активной зоны (плоская, положительное или отрицательное искривление), степень искривления;

16) наличие перфораций активной зоны;

17) содержание сложных синаптических устройств (дивергентное или конвергентное усложнение);

18) содержание аксосоматических, аксодендритических и аксошипиковых синапсов.

Межнейронные синапсы большого мозга человека изучали на материале, взятом из зоны ишемической полутени (перифокальная зона) при операциях по поводу тяжелой закрытой черепно-мозговой травмы ( $n=15$ ). Биопсийный материал фиксировали той же смесью фиксатора, но в режиме иммерсии [9].

Аналогичных комплексных систематизирующих морфометрических исследований ультраструктуры синапсов неокортекса после ишемического воздействия в доступных источниках информации не найдено.

В нейропиле СМК контрольных белых крыс преобладали простые неперфорированные синапсы со средним размером (длина — 0,20—0,45 мкм) контакта, пре- (площадь — 0,30—0,62 мкм<sup>2</sup>) и постсинаптической (площадь — 0,22—0,28 мкм<sup>2</sup>) зоны, равномерным распределением синаптических пузырьков, незначительным количеством митохондрий, мультивезикулярных тел, окаймленных везикул, эндо-, экзоцитозных фигур и крупных инвагинаций синаптической мембраны. Все это свидетельствовало о преобладании неактивных синапсов и стабильности синаптоархитектоники половозрелых животных [1, 2, 9, 14, 18]. Содержание синаптических терминалей с признаками очагового и светлого типа деструкции [1] было незначительным (2,8%, 95% ДИ 1,2—4,5%).

После ишемии в СМК статистически значимо увеличивалось относительное содержание синаптических терминалей, измененных по светлому типу деструкции, и уменьшалась общая численная плотность контактов (ОЧПК). Изменения подобного рода развивались быстро, отмеча-

лись, как правило, на фоне проявлений отека-набухания всех составляющих нейропиля. Через 30—90 мин после ишемии содержание деструктивных измененных синаптических терминалей увеличивалось до 15—30% (95% доверительный интервал), а ОЧПК снижалась на 18—45%. Максимальная гибель (40—45%) синапсов отмечалась после остановки сердца, вызванной асфиксией, а минимальная — при кровопотере (10—15%). Полной элиминации подвергались в основном незрелые (десмосомоподобные), а также мелкие и средние аксодендритические зрелые синапсы, расположенные на дистальных отделах дендритного дерева. Это приводило к увеличению относительного содержания крупных контактов и перераспределению синаптических входов нейрона. Вероятно, что крупные контакты, в силу большей массы парамембранного специализированного цитоскелета и большей площади контакта, обладают высокой структурной устойчивостью к повреждающим факторам ишемии [6, 8, 9, 11].

Таким образом, в остром постишемическом периоде именно крупные синапсы сохраняли стабильность пространственной организации нейронных сетей неокортекса, являясь своеобразными якорными образованиями нейрона. При этом структура сохранившихся синапсов существенно изменялась. В основном это касалось размеров и формы плотных проекций, распределения и количества синаптических пузырьков, степени искривления площади контакта. Превалировали положительно искривленные контакты с истонченным постсинаптическим уплотнением, низкими нечеткими плотными проекциями и высокой парамембранной концентрацией синаптических пузырьков.

Существенный дефицит ОЧПК (20—40%) и явные структурные проявления дисфункции механизмов регуляции водного и ионного гомеостаза (отек-набухание), трансинаптической передачи импульса (агломинация и разрушение синаптических пузырьков, повреждение плотных проекций) [1, 7] сохранялись в значительной части (30—45%) синапсов СМК через 1 и 3 сут. после ишемии. Однако в этот период параллельно с деструкцией и элиминацией синапсов активировались компенсаторно-восстановительные механизмы, обеспечивающие восстановление межнейронных взаимоотношений СМК [5—9]. Через 1 и 3 сут. на фоне низкой общей численной плотности синапсов (дефицит — 20—40%) увеличивалось количество функционально активных (с признаками экзо- и эндоцитоза синаптических пузырьков) крупных (0,45—0,80 мкм) неперфорированных и перфорированных контактов, терминалей с митохондриями, шипиков с активным шипиковым аппаратом и синапсов с крупными инвагинациями синаптической мембраны в зоне перфорации постсинаптического уплотнения.

Вполне вероятно, что появление перфораций в пресинаптической решетке и постсинаптическом уплотнении крупных контактах при ишемии облегчается в результате активации  $Ca^{2+}$ -зависимых механизмов превращения

жесткогелевого конформационного состояния парамембранного цитоскелета, свойственного неактивному синапсу, в золеподобное состояние [7, 8, 9, 11]. Это способствует локальному (в зоне высокой концентрации  $Ca^{2+}$ ) снижению прочности пресинаптической решетки и постсинаптического уплотнения с последующей рекомбинацией их по пути: дискообразные → фенестрированные → подковообразные → полностью сегментированные [9, 11]. Подобные синапсы с перфорированным и сегментированным контактом значительно превосходят по своим размерам и количеству активных зон простые неперфорированные синапсы, а, следовательно, обладают большей эффективностью [8, 9, 11]. Кроме того, в перфорированных синапсах снижаются биомеханические силы поперечного разрыва постсинаптического уплотнения и они становятся более стабильными [11].

Таким образом, перфорированные контакты появляются на месте крупных неперфорированных контактов в результате их высокой функциональной активности, сопровождающейся гипертрофией, расщеплением и рекомбинацией активной зоны. Дальнейшая реорганизация функционирующего синапса связана с образованием в перфорациях разделяющих активные зоны инвагинаций пре- и постсинаптической мембраны. В результате происходит образование сложных синаптических устройств и автономных синапсов. Пластическое обеспечение этого процесса, вероятно, связано с появлением мультивезикулярных тел, увеличением размеров шипикового аппарата, а также увеличением количества митохондрий и дендритных рибосомных комплексов. Все это рассматривается как комплекс взаимосвязанных структурных механизмов избирательной компенсаторной постишемической реорганизации отдельных синаптических входов нейронов с увеличением их эффективности [7—9, 11].

Следовательно, уменьшение общей численной плотности синапсов после острой ишемии приводило к активации и выраженной реорганизации сохранившихся функционально зрелых синапсов. Прежде всего, изменялись размеры и степень сложности организации синаптических устройств. Через сутки после ишемии статистически значимо увеличивалось относительное содержание положительно искривленных, крупных перфорированных контактов (до 15—35%, норма 8—12%), возрастало значение таких показателей, как площадь терминали (0,55—0,90 мкм<sup>2</sup>), диаметр пресинаптической решетки и постсинаптического уплотнения (0,50—0,80 мкм), число активных зон контакта (3 и более). Увеличивалось содержание синапсов с митохондриями, шипиковым аппаратом, мультивезикулярными телами и инвагинациями синаптических мембран. Создавались условия для усложнения синаптических устройств по конвергентному или дивергентному типу и реорганизации межнейронных отношений с усилением эффективности межнейронной передачи информации [8, 9].



В постишемическом периоде содержание синаптических устройств с дивергентным типом усложнения на 22,4% (95% ДИ 19,8—32,1%) превосходило таковое в контроле, а синаптических устройств с конвергентным типом усложнения — на 14,8% (95% ДИ 8,9—17,4%). Отмечена следующая закономерность: чем больше синапсов необратимо повреждается в раннем постишемическом периоде, тем более радикальным является последующая компенсаторная реорганизация межнейронных взаимоотношений [2, 9]. Происходит своеобразное конкурентное усиление отдельных, преимущественно возбуждающих, синаптических входов. Это, несомненно, приводит к дисбалансу возбуждающих и тормозных систем нейрона, изменениям интегративно-пусковой деятельности СМК, в целом [5, 8, 9].

Предполагается, что активно функционирующие синапсы могут вытеснять неактивные и замещать поврежденные синапсы, существенно изменяя карту синаптических входов и пространственную организацию дендритного дерева нейронов в отдаленном постишемическом периоде [9, 12]. По нашим данным, максимальное образование гипертрофированных синапсов и усложненных синаптических устройств в СМК происходит через 3, 7 и 14 сут. после острой ишемии [8, 9]. Поэтому именно в этот период нейронная сеть с большим количеством высокоэффективных синапсов является потенциально опасной по вероятности формирования независимых патологических систем головного мозга при появлении гиперактивных нейронов [8, 9, 11, 14]. Нами показано появление судорожных пароксизмов в постишемическом периоде на фоне звукового раздражения [2], что подтверждается другими исследователями при иных воздействиях [14]. Следовательно, после острой ишемии снижается порог чувствительности нейронов к эпилептиформному раздражителю и повышается вероятность формирования патологических систем головного мозга [4, 8, 9]. Существенно то, что даже через 30 и 60 сут. после ишемии не происходит восстановления баланса между деструктивно измененными и не измененными, зрелыми и незрелыми, активными и неактивными, крупными и мелкими, простыми и сложными синапсами до контрольного уровня [2, 9]. Поэтому процесс реорганизации межнейронных отношений, запущенный сразу после ишемии, реализуется циклично, длительно и перманентно [6—8].

Таким образом, нейронная сеть СМК после ишемии обладает меньшей, чем в норме, стабильностью пространственной организации и нуждается в постоянной и длительной коррекции межнейронных отношений за счет механизмов синаптической пластичности. Последнее происходит не только путем реорганизации функционально зрелых синапсов, но также за счет активации неосинаптогенеза и ускоренного созревания незрелых контактов [7, 9].

В норме нейропил СМК обладает очень высоким синаптогенным потенциалом. Почти 20—25% контактов СМК контрольных животных являются мелкими незрелыми симметричными (десмосомоподобными) образованиями без синаптических пузырьков [9]. Эти контакты равномерно распределены в нейропиле и, вероятно, представляют своеобразный генетически детерминированный резервный пул (провизорный субстрат), предназначенный для быстрой реализации механизмов компенсаторного синаптогенеза и перестройки межнейронных отношений при повреждении мозга [15, 29, 36]. В остром постишемическом периоде равновесие в популяции мелких незрелых контактов, имеющих незначительную термодинамическую устойчивость [11], смещается в сторону их деструкции. Однако молекулярные системы этих контактов на пре- и постсинаптических мембранах, вероятно, сохраняются и обеспечивают быстрое восстановление пула незрелых синапсов при нормализации кровоснабжения головного мозга. В пользу этого свидетельствуют наши данные о скачкообразном увеличении плотности незрелых и смешанных контактов через 3 и 7 суток после ишемии до близкого к контролю уровня (на фоне низкой плотности зрелых синапсов) [5, 9]. Неосинаптогенез и быстрое созревание уже существующих незрелых контактов существенно усиливают возможности восстановления поврежденных нейронных сетей СМК [6]. На фоне компенсаторной реорганизации зрелых синапсов и усиления в результате этого ранее существовавших нейронных цепей, становится возможным образование новых связей и нейронных систем.

Таким образом, анализ полученных данных свидетельствует о том, что вне зависимости от этиологии ишемии в сенсомоторной коре мозга млекопитающих реализуется комплекс универсальных структурных механизмов постишемической реорганизации синаптоархитектоники. В результате этого восстанавливается интегративно-пусковая деятельность неокортекса. Вместе с тем возрастает вероятность формирования патологических систем мозга на базе реорганизованных нейронных сетей, насыщенных высокоэффективными синапсами, что может служить основой генерации новых нейронных цепей и формирования ими абберантных синаптических связей в зрелом мозге в постишемическом периоде. В связи с этим необходимо учитывать полученные нами данные о закономерностях реорганизации межнейронных отношений в коре большого мозга млекопитающих после перенесенной острой ишемии при разработке способов восстановления функций поврежденного головного мозга. Особое внимание целесообразно уделить дальнейшему изучению структурно-функциональных последствий искусственной стимуляции синапто- и нейрогенеза в постишемическом периоде с помощью различных препаратов, трофических факторов и клеточных технологий.

## Список литературы

1. **Боголепов Н.Н.** Ультраструктура мозга при гипоксии. — М.: Медицина, 1979. — 167 с.
2. **Грицаенко О.С., Семченко В.В.** Экспериментальное обоснование использования препарата церебро в отдаленном постинсультном периоде на фоне хронического стресса // Медицинская наука и образование Урала. — 2009. — Т. 3, № 59. — С. 7–9.
3. **Гусев Е.И., Скворцова В.И.** Ишемия головного мозга. — 2001. — 328 с.
4. **Ерешев С.И., Семченко В.В., Генне Р.И., Маковецкий К.К.** Порог чувствительности к эпилептиформному раздражителю при внутримозговой аллотрансплантации эмбриональной нервной ткани различной эргичности // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1993. — Т. 115, № 1. — С. 71–74.
5. **Семченко В.В., Степанов С.С., Алексеева Г.В.** Постаноксическая энцефалопатия. — Омск, 1999. — 448 с.
6. **Семченко В.В., Боголепов Н.Н., Степанов С.С.** и др. Синаптическая пластичность неокортекса белых крыс при диффузно-очаговых повреждениях головного мозга // Морфология. — 2005. — Т. 128, № 4. — С. 76–81.
7. **Семченко В.В., Степанов С.С.** Структурная организация синапсов как детерминирующий фактор избирательной чувствительности и пластичности нейронов мозга в postanоксическом периоде // Вестн. Рос. АМН. — 1999. — № 7. — С. 36–40.
8. **Семченко В.В., Степанов С.С., Десятниченко А.К.** Гипертрофия синапсов как фактор формирования устойчивых патологических систем мозга в позднем постренимационном периоде // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 2000. — Т. 129, № 5. — С. 449–451.
9. **Семченко В.В., Степанов С.С., Боголепов Н.Н.** Синаптическая пластичность головного мозга. — Омск: Омская областная типография, 2008. — 408 с.
10. **Сотников О.С.** Статика и структурная кинетика живых асинаптических дендритов. — СПб.: Наука. Санкт-Петербургское отделение, 2008. — 397 с.
11. **Степанов С.С., Семченко В.В.** Структурные основы изменения термодинамической устойчивости синапсов коры большого мозга белых крыс в постасфиксическом периоде // Морфология. — 1998. — Т. 113, № 1. — С. 58–61.
12. **Anderson B.J.** Plasticity of gray matter volume: the cellular and synaptic plasticity that underlies volumetric change // Dev. Psychobiol. — 2011. — Vol. 53, № 5. — P. 456–465.
13. **Ch'ng T.H., Martin K.C.** Synapse-to-nucleus signaling // Curr. Opin. Neurobiol. — 2011. — Vol. 21, № 2. — P. 345–352.
14. **Christoffel D.J., Golden S.A., Russo S.J.** Structural and synaptic plasticity in stress-related disorders // Rev. Neurosci. — 2011. — Vol. 22, № 5. — P. 535–549.
15. **Cline H.** Synaptogenesis: a balancing act between excitation and inhibition // Curr. Biol. — 2005. — Vol. 15, № 6. — P. 203–205.
16. **Doyle M., Kiebler M.A.** Mechanisms of dendritic mRNA transport and its role in synaptic tagging // EMBO J. — 2011. — Vol. 30, № 17. — P. 3540–3552.
17. **Feldman D.E.** Synaptic mechanisms for plasticity in neocortex // Annu. Rev. Neurosci. — 2009. — Vol. 32. — P. 33–55.
18. **Fu M., Zuo Y.** Experience-dependent structural plasticity in the cortex // Trends Neurosci. — 2011. — Vol. 34, № 4. — P. 177–187.
19. **Fukuda T.** Structural organization of the gap junction network in the cerebral cortex // Neuroscientist. — 2007. — Vol. 13, № 3. — P. 199–207.
20. **Kennedy M.J., Ehlers M.D.** Mechanisms and function of dendritic exocytosis // Neuron. — 2011. — Vol. 69, № 5. — P. 856–875.
21. **Kokaia M.** Seizure-induced neurogenesis in the adult brain // Eur. J. Neurosci. — 2011. — Vol. 33, № 6. — P. 1133–1138.
22. **Krubitzer L.** In search of a unifying theory of complex brain evolution // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2009. — Vol. 1156. — P. 44–67.
23. **Liu-Yesucevitz L., Bassell G.J., Gitler A.D.** et al. Local RNA translation at the synapse and in disease // J. Neurosci. — 2011. — Vol. 31, № 45. — P. 16086–16093.
24. **MacLeod K.M.** Short-term synaptic plasticity and intensity coding // Hear Res. — 2011. — Vol. 279, № 1–2. — P. 13–21.
25. **Maffei A.** The many forms and functions of long term plasticity at GABAergic synapses // Neural Plast. — 2011. — Vol. 2011. — P. 1–9.
26. **Marder E.** Variability, compensation, and modulation in neurons and circuits // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2011. — Vol. 108. — P. 15542–15548.
27. **Markus H.S.** Cerebral perfusion and stroke // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. — 2004. — Vol. 75, № 3. — P. 353–361.
28. **Melom J.E., Littleton J.T.** Synapse development in health and disease // Curr. Opin. Genet. Dev. — 2011. — Vol. 21, № 3. — P. 256–261.
29. **Nathan P.J., Cobb S.R., Lu B.** et al. Studying synaptic plasticity in the human brain and opportunities for drug discovery // Curr. Opin. Pharmacol. — 2011. — Vol. 11, № 5. — P. 540–548.
30. **Ovsepian S.V., Dolly J.O.** Dendritic SNAREs add a new twist to the old neuron theory // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2011. — Vol. 108, № 48. — P. 19113–19120.
31. **Patterson M., Yasuda R.** Signalling pathways underlying structural plasticity of dendritic spines // Br. J. Pharmacol. — 2011. — Vol. 163, № 8. — P. 1626–1638.
32. **Penzes P., Cahill M.E., Jones K.A.** et al. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders // Nat. Neurosci. — 2011. — Vol. 14, № 3. — P. 285–293.
33. **Rusakov D.A., Zheng K., Henneberger C.** Astrocytes as regulators of synaptic function: a quest for the Ca<sup>2+</sup> master key // Neuroscientist. — 2011. — Vol. 17, № 5. — P. 513–523.
34. **Schubert D., Kotter R., Staiger J.F.** Mapping functional connectivity in barrel-related columns reveals layer- and cell type-specific microcircuits // Brain Struct. Funct. — 2007. — Vol. 212, № 2. — P. 107–119.
35. **Spruston N.** Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration // Nat. Rev. Neurosci. — 2008. — Vol. 9, № 3. — P. 206–221.
36. **Toni N., Sultan S.** Synapse formation on adult-born hippocampal neurons // Eur. J. Neurosci. — 2011. — Vol. 33, № 6. — P. 1062–1068.
37. **Waite C.L., Garner C.C.** Presynaptic function in health and disease // Trends Neurosci. — 2011. — Vol. 34, № 6. — P. 326–337.
38. **Yuste R.** Dendritic spines and distributed circuits // Neuron. — 2011. — Vol. 71, № 5. — P. 772–781.
39. **Zheng C.Y., Seabold G.K., Horak M., Petralia R.S.** MAGUKs, synaptic development, and synaptic plasticity // Neuroscientist. — 2011. — Vol. 17, № 5. — P. 493–512.

Поступила 10.09.12

## Сведения об авторах:

**Степанов Сергей Степанович**, д-р мед. наук, науч. сотр. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО «ОмГМА» Минздравсоцразвития, науч. сотр. лаб. гипоксических повреждений мозга и нейрореабилитации Омского НИЦ СО РАМН

**Боголепов Николай Николаевич**, акад. РАМН, д-р мед. наук, проф., зав. лаб. ультраструктуры и цитохимии мозга ФГБУ «НЦН» РАМН

**Ерешев Степан Иванович**, д-р мед. наук, проф. каф. медицины труда и профессиональных заболеваний «ОГМА», врач невролог высшей категории, научный сотрудник лаборатории гипоксических повреждений мозга и нейрореабилитации Омского НИЦ СО РАМН

А.Г. Портниченко

## Факторы роста и адаптация миокарда к гипоксии

Международный центр астрономических и медико-экологических исследований НАН Украины,  
Украина, 03680, г.Киев, ул. Заболотного, 27  
Институт физиологии им. А.А.Богомольца НАН Украины, Украина, 01024, г.Киев, ул. Богомольца, 4

*Рассматриваются современные данные о регуляции индукции факторов роста, опосредованной транскрипционным фактором HIF, общих и специфических эффектах и механизмах действия ростовых факторов в миокарде. Результаты собственных исследований экспрессии субъединиц HIF-1 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$ , факторов роста IGF-1, bFGF, шаперонов HSP70 и HSP60 в миокарде крыс при действии хронической гипобарической гипоксии и гипоксического preconditionирования свидетельствуют о тщательной регуляции количества и продолжительности действия этих белков в каждом желудочке сердца в зависимости от нагрузки на него, до достижения адаптации. Индукция IGF-1 в миокарде при гипоксическом preconditionировании является отсроченной и транзитной, преобладает в правом желудочке на 3 сутки, и сопровождается индукцией белка-синергиста HSP60. Адаптация миокарда к хронической гипоксии и гипоксическое ремоделирование сердца сопровождаются значительным повышением соотношения экспрессии мРНК HIF-3 $\alpha$ /HIF-1 $\alpha$ , что ограничивает функцию последней, редукцией IGF-1 — опосредованной метаболической и тканевой перестройки, интенсификацией экспрессии шаперонов.*

**Ключевые слова:** гипоксическое preconditionирование, хроническая гипоксия, HIF, факторы роста, IGF-1, шапероны

A.G. Portnychenko

## Growth factors and adaptation of myocardium to hypoxia

International Center for Astronomical, Medical and Ecological Research, 27, Akademika Zabolotnoho str., Kyiv, 03680, Ukraine  
Bogomoletz Institute of Physiology, 4, Bogomoletz str., Kyiv, 01024, Ukraine

*The article reviews current data on the regulation of induction of growth factors, mediated by transcription factor HIF, as well as on common or specific effects and mechanisms of growth factor action in the myocardium. Our investigations of expression of HIF-1 $\alpha$  and HIF-3 $\alpha$  subunits, growth factors IGF-1 and bFGF, HSP70 and HSP60 chaperones in the myocardium of rats under the influence of chronic hypobaric hypoxia, and hypoxic preconditioning suggest a careful regulation of amount of these proteins and term of their action in each heart ventricle, depending on the its load, to achieve adaptation. The induction of IGF-1 in the myocardium following hypoxic preconditioning is delayed and transient, dominated by the right ventricle on day 3, and is accompanied by induction of protein-synergist HSP60. Myocardial adaptation to chronic hypoxia and hypoxic cardiac remodeling are accompanied by a significant increase in the ratio of mRNA expression HIF-3 $\alpha$ /HIF-1 $\alpha$ , which limits the function of the latter, a reduction of IGF-1 — mediated metabolic and tissue rebuilding, and intensified expression of chaperones.*

**Key words:** hypoxic preconditioning, chronic hypoxia, HIF, growth factors, IGF-1, chaperones

Адаптивный ответ тканей на действие гипоксии включает в себя функциональные и структурные изменения. В миокарде структурные изменения, или ремоделирование, являются ответом на хроническое увеличение гемодинамической и нейрогормональной стимуляции, с одной стороны, и внутриклеточные изменения состава и функции белков, с другой. При недостаточной регуляции этот процесс может становиться дизадаптивным, приводя к патологическим структурным и функциональным изменениям с необратимым исходом в сердечную недостаточность.

**Для корреспонденции:** Портниченко Алла Георгиевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., зав. лаб. молекулярной биологии ИЦ АМЭИ НАН Украины. E-mail: port@biph.kiev.ua

Молекулярные механизмы ремоделирования предшествуют структурным изменениям на клеточном и тканевом уровнях и начинают развиваться немедленно после активации сигнальных путей клетки вследствие уменьшения доступности кислорода и/или вызванной этим нехватки энергетических субстратов. Вызванная гипоксией включение сигнальных механизмов приводит к активации генетического аппарата клетки благодаря действию белков — транскрипционных факторов, которые опосредуют транскрипцию так называемых генов-мишеней. Последние способствуют адаптации к гипоксии, поддерживая выживание клеток [43, 46, 59]. Поскольку в ремоделировании миокарда доминируют процессы клеточного рос-

та и тканевой перестройки, связанные с гипертрофией и апоптозом кардиомиоцитов, пролиферацией фибробластов и изменениями экстрацеллюлярного матрикса [18, 40], среди значительного количества генов-мишеней факторы роста играют одну из основных ролей в адаптации миокарда к гипоксии и его моделировании.

### **Гипоксия-индуцибельный фактор HIF и новые механизмы регуляции его экспрессии и функции**

Одним из основных транскрипционных факторов, активирующихся при гипоксии, является гипоксия-индуцибельный фактор (HIF) — регулятор, поддерживающий кислородный гомеостазис на клеточном уровне и обеспечивающий выживание клеток [43, 46, 59]. HIF — гетеродимерный комплекс, состоящий из  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц [24]. У человека обнаружены четыре субъединицы HIF: HIF-1 $\alpha$ , -2 $\alpha$ , -3 $\alpha$ , и HIF-1 $\beta$  (ARNT). Каждый из этих белков содержит bHLH- и PAS-домены, которые участвуют в гетеродимеризации и связывании ДНК [24]. HIF-1 $\alpha$  и -2 $\alpha$  имеют два трансактивационных домена — NAD и CAD, HIF-1 $\beta$  содержит один такой домен (TAD). Трансактивационная способность HIF зависит также от присоединения транскрипционных коактиваторов, таких, как p300/CBP, к CAD HIF- $\alpha$ . Кроме того, HIF- $\alpha$ -субъединицы содержат уникальный кислородзависимый деградационный домен (ODD), который детерминирует стабильность протеина HIF- $\alpha$  [24, 46]. При гипоксии HIF- $\alpha$  стабилизируется и гетеродимеризуется с HIF-1 $\beta$ , этот комплекс транслируется в ядро и связывается с 5'-RCGTC-3' гипоксия-респонсивным элементом (HRE) энхансеров/промоторов генов для запуска их транскрипции [24, 43, 46].

HIF-3 $\alpha$  — протеин (73 kDa), экспрессия которого также обнаружена в сердце [20, 22]. Исследования показали, что HIF-3 $\alpha$  димеризуется с ARNT, а образующийся гетеродимер распознает HRE. HIF-3 $\alpha$  имеет NAD, ODD, однако не содержит CAD [20, 21], поэтому является более слабым транскрипционным фактором, чем HIF-1 $\alpha$  и -2 $\alpha$  [21]. Белок HIF-3 $\alpha$  таким же образом, как HIF-1 $\alpha$  и -2 $\alpha$ , подвергается протеасомальной деградации в зависимости от наличия кислорода [20, 21, 34].

Показано, что HIF-3 $\alpha$  может быть супрессором HIF-1 $\alpha$ /-2 $\alpha$ -индуцированной экспрессии генов [21]. Альтернативные сплайсинговые варианты HIF-3 $\alpha$ , в частности ингибиторный PAS-белок (IPAS) у мышей и HIF-3 $\alpha$ 4 у человека [33, 34], димеризуются с HIF-1 $\beta$ , образуя комплекс, не связывающийся с HRE, что препятствует HIF-индуцированной эксп-

рессии генов-мишеней. IPAS и HIF-3 $\alpha$ 4 не имеют ODD (таким образом, не регулируются кислородом) и трансактивационных доменов, и функционируют как доминант-негативная субъединица HIF. Этот антагонист транскрипционной активности HIF-1 $\alpha$  может вызывать супрессию неоваскуляризации в тканях с физиологически низким напряжением кислорода, например, в корнеальном эпителии [33, 34]. Таким образом, сплайсинг мРНК HIF-3 $\alpha$  до доминант-негативных изоформ, усиливающийся при гипоксии [20, 33, 34], может представлять собой важный регуляторный путь HIF-опосредованной экспрессии генов.

Функциональная активность HIF отличается многоуровневой регуляцией. Прежде всего, тщательно регулируется экспрессия белка субъединиц HIF (на транскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях), следующим регуляторным звеном является контроль его трансактивационной функции. В свою очередь, уровень экспрессии белка в клетке в реальный момент времени определяется соотношением его синтеза и деградации.

На транскрипционном уровне экспрессия белка разных субъединиц HIF регулируется неодинаково. При нормоксии в миокарде обнаружены умеренные уровни экспрессии мРНК субъединиц HIF-1 $\alpha$ , -1 $\beta$  и -2 $\alpha$ , которые не обнаруживали значительного роста при гипоксии [22], что свидетельствует об их ограниченной транскрипционной регуляции. Функции и регуляция HIF-3 $\alpha$  менее изучены, однако показано, что при гипоксии эта субъединица способна к быстрой индукции на транскрипционном уровне, что может являться быстрореагирующим звеном системы HIF в защите от гипоксического повреждения [22]. Трансляционная регуляция HIF-1 $\alpha$  обеспечивается повышением трансляции мРНК через активацию p3K/Akt [61], благодаря чему поддерживается синтез этого белка в гипоксических условиях, несмотря на общее ингибирование синтеза белка в клетке [59].

Наиболее мощным регуляторным звеном для HIF- $\alpha$ -субъединиц является посттрансляционная модификация, в том числе фосфорилирование, ацетилирование, пролилгидроксилирование, убиквитинирование и другие биохимические преобразования белка, влияющие на его активность или способствующие деградации. Наиболее подробно изучены механизмы деградации HIF- $\alpha$  как клеточная составляющая кислородного сенсинга. В нормоксических условиях  $\alpha$ -субъединицы HIF подвергаются O<sub>2</sub>-зависимому гидроксилированию пролиновых остатков (Pro<sup>402</sup> и/или Pro<sup>564</sup>), которое катализируется белками с пролилгидроксилазным доменом (PHD1-3). Гидроксилированные молекулы HIF- $\alpha$  затем подвергаются убиквитинированию комплексом E3- убиквитинлигазы с белком von Hippel-Lindau (pVHL) и последующему расщеп-

лению 26S-протеасомой [30, 46, 55]. Активность гидроксилаз ингибируется нехваткой кислорода, накоплением метаболитов цикла трикарбоновых кислот (изоцитрата, оксалоацетата, сукцината, fumarата), а также продукцией свободнорадикальных хелаторов Fe(II), связанного с PND [19, 46]. Поскольку эти метаболические сдвиги наиболее характерны для гипоксических состояний, гипоксия является основным индуктором функции HIF- $\alpha$ , а результат такой активации направлен прежде всего на компенсацию и/или предупреждение подобных метаболических сдвигов и, таким образом, является одним из ключевых механизмов адаптации к гипоксии.

Накопление белка HIF- $\alpha$  при гипоксии, как принято считать, происходит вследствие деактивации PND и ингибирования O<sub>2</sub>-зависимой деградации HIF- $\alpha$  протеасомой при участии pVHL [19]. Однако недавние исследования указывают на более сложное соотношение этих процессов. С одной стороны, экспрессия белка HIF-1 $\alpha$  при гипоксии повышается вследствие его стабилизации и поддержания синтеза. С другой стороны, обнаружены новые механизмы деградации HIF- $\alpha$ , не зависящие от кислорода и pVHL [59], которые могут уменьшать экспрессию этого фактора при гипоксии. При нормоксии продемонстрирован новый механизм деградации HIF-1 $\alpha$  с участием pVHL, но не опосредованный PND 1-3 [9]. PND также способны модифицировать активность HIF независимо от гидроксилазного действия. Поскольку PND2 и PND3 индуцируются HIF-1 $\alpha$  при гипоксии, ингибирование PND нехваткой кислорода, NO или другими стимулами с последующей стабилизацией HIF- $\alpha$  может приводить к индукции PND и восстановлению их функции. Такой механизм отрицательной обратной регуляции HIF- $\alpha$  — субъединиц при гипоксии может обеспечивать быструю их деградацию при нормоксии благодаря повышению экспрессии PND [19].

Продолжается идентификация белков, участвующих в этих регуляторных механизмах. Белки теплового шока (HSP) представляют интегральный компонент накопления HIF-1 $\alpha$  в клетке. HSP90 $\beta$  связывается с HIF-1 $\alpha$  и обеспечивает фолдинг и стабилизацию этого белка в нормоксических и гипоксических условиях. HSP70 непосредственно связывается с ODD HIF-1 $\alpha$  и защищает его от O<sub>2</sub>-зависимой деградации. Активация PI3K/Akt при гипоксии может усиливать гипоксическую стабилизацию HIF-1 $\alpha$ , повышая экспрессию Hsp90 и Hsp70 [30, 53, 61].

Установлено участие белков элонгина-С и -В, кулина 2 в pVHL — E3-убиквитинлигазном комплексе при O<sub>2</sub>-зависимой деградации HIF-1 $\alpha$ . В отличие от этого, при O<sub>2</sub>-независимой деградации E3-убиквитинлигаза связывается только с элонгином

С. Рецептор активированной С-киназы 1 (RACK1) конкурирует с HSP90 за связывание с HIF-1 $\alpha$ , затем взаимодействует с элонгином-С и стимулирует pVHL- и O<sub>2</sub>-независимую деградацию HIF-1 $\alpha$  в комплексе с HSP70 [30, 46]. Подобным образом действует и белок, содержащий домен метаболизма меди MURR1 (COMMD1) [53]. Кальциневрин, серин-треониновая фосфатаза, под действием кальция и кальмодулина блокирует димеризацию и активацию RACK1, способствуя накоплению HIF-1 $\alpha$  [31].

Эндотелин-1, действуя через эндотелиновые В-рецепторы и PI3K-ILK-AKT-mTOR-зависимый механизм, ингибирует экспрессию гена PND2, тем самым повышая экспрессию HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  и VEGF [48].

В качестве альтернативного пути регуляции стабильности HIF-1 $\alpha$  указывают также на роль АМФ-активируемой протеинкиназы (АМРК), которая рассматривается как энергетический сенсор в условиях нехватки АТФ. Ингибирование АМРК редуцирует стабилизацию HIF-1 $\alpha$  под действием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и повышает убиквитинирование HIF-1 $\alpha$  [26].

Несмотря на известное ингибиторное действие активных кислородных метаболитов (АКМ) на PND, роль АКМ в стабилизации HIF-1 $\alpha$ , по-видимому, зависит от экспериментальных условий [1, 16, 28, 38]. Резюмируя результаты исследований, можно отметить, что химическое взаимодействие АКМ с NO способно концентрационно-зависимым путем регулировать, в том числе и нивелировать, их влияние на активность PND и деградацию HIF.

NO может разнонаправленно влиять на активность PND, ингибируя ее при высоких концентрациях (>1 мкМ) путем связывания Fe(II), такой механизм стабилизации HIF-1 $\alpha$  обнаруживается при нормоксии. В низких концентрациях (<0,4 мкМ) NO стимулирует активность PND, увеличивая биодоступность кислорода для этих ферментов, этот механизм проявляется в гипоксических условиях. Повышение окислительного фосфорилирования при гипоксии также может приводить к ингибированию активности PND вследствие роста продукции АКМ в митохондриях и цитозоле. Механизм ингибирования этих ферментов АКМ опосредуется через связывание Fe(II), ассоциированного с PND, и окисление его в Fe(III). NO, подавляя функцию митохондрий и образование АКМ, может в этих условиях активировать PND [11, 19].

С учетом неоднозначности экспериментальных данных представляется вероятным, что эндогенные механизмы регуляции функции HIF- $\alpha$  действуют более ограниченно и целенаправленно, а механизмы регуляции функции HIF-1 $\alpha$  при введении экзогенных стимуляторов или при патологии становятся более

многоуровневыми. Так, в опухолевых клетках, дефицитных по Mn-SOD и отличающихся высоким внутриклеточным содержанием АКМ, продемонстрирован рост экспрессии HIF-1 $\alpha$  вследствие активации как транскрипционных, так и трансляционных и посттрансляционных регуляторных механизмов [44].

Трансактивационную активность HIF-1 $\alpha$  регулирует O<sub>2</sub>-зависимое гидроксирование аспарагиновых остатков в C-терминальном ODD HIF-1 $\alpha$  фактором ингибции HIF-1 (FIH-1), который препятствует функциональному взаимодействию HIF-1 $\alpha$  с CBP/p300, коактиватором HIF-зависимой транскрипции генов-мишеней [46, 55].

Активность транскрипционных факторов, в том числе HIF, регулирует и сравнительно недавно открытый малый модификатор, относящийся к убиквитину (SUMO). SUMO-1, -2 и -3 конъюгируют с ODD HIF-1 $\alpha$  и -2 $\alpha$  и уменьшают их транскрипционную активность, не стимулируя деградацию белка. Этот механизм посттрансляционной модификации белка получил название «сумоилирование» (sumoylation). При гипоксии обнаружена индукция SUMO-1 в сердце, что может ограничивать гипоксическую индукцию генов-мишеней, в том числе, регулировать сдвиг клеточного метаболизма в сторону гликолиза [7, 47, 54]. Вследствие избирательной регуляции, функции HIF-1 $\alpha$  и HIF-2 $\alpha$  могут быть реципрокными при гипоксии, как это было продемонстрировано при заглушении этих генов с помощью siРНК [14].

### **Факторы роста, их индукция при гипоксии и роль в ремоделировании миокарда**

Стабилизация и активация HIF вызывает индукцию факторов роста, вовлеченных в ангиогенез, эритропоэз, клеточное выживание и пролиферацию [13, 18, 43, 46]. Среди них наиболее изученным является семейство сосудистых эндотелиальных факторов роста VEGF, в которое входят VEGF-A, VEGF-B и недавно открытый плацентарный фактор роста PlGF [39]. Эти факторы являются основными регуляторами ангиогенеза как в эмбриональном сердце, так и в ишемизированном и ишемизированном миокарде взрослых животных. В эмбриональном сердце основную роль играет VEGF-A, а VEGF-B и PlGF вовлечены в процессы постшемической ревазуляризации. Фактор роста фибробластов bFGF (FGF2) принимает участие в ангиогенезе при воспалении, а также опосредует ремоделирование соединительной ткани в миокарде [39, 40, 43]. Семейство ангиопоэтиноподобных факторов осуществляет ремоделирование сосудов и артериогенез, в том числе постшемический, тромботический фактор роста PDGF-B участвует в привлечении перидитов при ревазуляризации [15, 52].

Для многих сигнальных и эффекторных механизмов при гипоксии характерна обратная регуляция. Большинство из факторов роста, индуцируемых HIF-1, способно вторично стабилизировать этот транскрипционный фактор и усиливать пролиферативный ответ. Факторы роста, действуя через митоген-активируемые протеинкиназы p42/p44 MAPK, с одной стороны, индуцируют VEGF с помощью комплекса факторов транскрипции Sp1/AP-2, а с другой, фосфорилируют HIF-1 $\alpha$ , повышая его трансактивационную активность. Стресс-активируемые протеинкиназы (SAPK) стабилизируют мРНК VEGF. Все эти сигнальные пути, в результате, действуют как синергисты в отношении VEGF-опосредованного ангиогенеза [15, 35]. Трансформирующий ростовой фактор TGF- $\beta$ 1 ингибирует транскрипцию PHD2 через Smad-опосредованный механизм, что может противодействовать гипоксической индукции PHD2 [19, 36].

Обратная стимуляторная регуляция установлена и во взаимодействии факторов роста и газотрансмиттеров, индуцируемых при гипоксии. NO, продуцируемый eNOS, необходим для ангиогенеза в сердце. У мышей, дефицитных по гену eNOS (-/-), наблюдали снижение плотности капилляров в миокарде левого желудочка сердца и дефекты аортального клапана [60]. Эти нарушения могли быть связаны с дефектами индукции VEGF, поскольку промотор гена VEGF содержит NO-респонсивные элементы, локализованные рядом с HRE, и вследствие этого является мишенью для действия NO [27]. У eNOS (-/-) мышей также не осуществлялся ангиогенез, опосредованный ангиопоэтином-1 и ангиопоэтин-зависимым фактором роста AGF [52]. Помимо действия на ангиопоэз, миокардиальная eNOS способна стимулировать миграцию мезенхимальных стволовых клеток в ишемизированный миокард, оказывая пролиферативный эффект и улучшая функцию сердца [29].

В свою очередь, факторы роста могут действовать как коронарные и периферические вазодилататоры, индуцируя NO-зависимое расслабление артерий. Таким действием, опосредованным через рецепторы VEGFR-1 и -2, обладают VEGF и PlGF, а также AGF, стимулирующий eNOS путем активации киназ ERK1/2 [39]. VEGF вызывает активацию eNOS через несколько сигнальных механизмов: Akt/PKB, Ca<sup>(2+)</sup>/кальмодулин, PKC. При этом VEGF-опосредованная продукция NO и NO-опосредованная индукция VEGF регулируются через стабилизацию HIF-1 и активность еще одного гена-мишени — гемоксигеназы-1 (HO-1, или HSP32), в зависимости от количества продуцированного NO. Такие реципрокные взаимоотношения между NO и VEGF рассматриваются как регулирующие ангиогенез в нормальной ткани [27]. В то же время, активируя AMPK $\alpha$ 1,

VEGF может индуцировать ангиогенез независимо от активации eNOS [49]. Таким образом, гипоксия является индуктором iNOS, HO-1 и ростовых факторов, последние в свою очередь активируют eNOS [3], а повышение продукции NO и CO этими ферментами в еще большей степени способно индуцировать пролиферативный ответ на действие гипоксии.

В качестве стимулятора ангиогенеза значительную роль могут также играть АКМ, продуцируемые митохондриями. Повышение продукции  $H_2O_2$  ингибирует редокс-активируемую фосфатазу pTEN, действие которой препятствует активации p13K-Akt и индукции VEGF [17].

Среди эндогенных ингибиторов ангиогенеза в сердце могут иметь значение тромбоспондин-1 и -2, фактор тромбоцитов-4, интерферон- $\alpha$  и - $\beta$ , ангиостатин, производные коллагена эндостатин, аррестен, кенстатин и тамстатин, производные гормона роста вазогибины, ген ответа на комплемент RGC-32 и др. факторы, однако их роль на сегодняшний день сравнительно мало изучена. Показано, что вазогибины и RGC-32 индуцируются факторами роста VEGF и bFGF и являются звеном обратной негативной регуляции ангиогенеза при гипоксии. Тромбоспондины и вазогибины блокируют продукцию NO ферментами eNOS и iNOS, соответственно, таким образом предотвращая их стимуляторное влияние на ангиогенез, опосредованное через растворимую гуанилатциклазу [8, 37, 45].

Помимо своего действия как фактора роста, VEGF, синтезированный в гипоксических кардиомиоцитах, является индуктором кардиопротекторных белков, в частности, COX-2, посредством активации PKC и iNOS, а также поддерживает защиту от инфаркта, активируя p13K-Akt [3, 56, 58]. При гипертрофии миокарда VEGF противодействует развитию сердечной недостаточности, поддерживая баланс деления и слияния митохондрий, пролиферацию кардиомиоцитов и предупреждая развитие апоптоза [58].

Эритропоэтин — гликопротеин, известный как основной стимулятор эритропоэза [13]. Однако на кардиомиоцитах и эндотелиальных клетках также обнаружены рецепторы к эритропоэтину, стимуляция которых уменьшает повреждение клеток, апоптоз, окислительный стресс и воспалительные процессы в миокарде. Сигнальные пути этих протекторных эффектов опосредованы активацией киназ p13K и Akt и ингибированием GSK-3 $\beta$ , а также активацией киназ PKC, ERK1/2 и калиевых каналов. Эритропоэтин улучшает сократительную функцию сердца при гипоксии/ишемии, уменьшает размер инфаркта и развитие аритмий. В эндотелиальных клетках аорты эритропоэтин действует также на  $\beta$ -общие рецепторы ( $\beta$ CR), индуцируя формирование комплексов  $\beta$ CR-AMPK-eNOS, продукцию NO и ангиогенез [13, 50, 51].

Среди факторов роста, индуцируемых гипоксией, все большее внимание привлекает инсулиноподобный фактор роста (IGF), объединяющий в себе свойства пролиферативного фактора и регулятора метаболизма [23]. IGF-1 и менее изученный IGF-2 — пептидные тканевые гормоны, структурно подобные инсулину. Действуя на специфические рецепторы клеточной мембраны (IGF-1r) и инсулиновые рецепторы, IGF-1 активирует синтез ДНК, метаболизм глюкозы, ингибирует апоптоз путем активации MAPK, p13K-Akt и Bad-опосредованного ингибирования митохондриально-зависимой активации каспаз, стимулирует деление, рост и миграцию клеток посредством MAPK (MEK1/ERK), PKC $\epsilon$  и Rac [23, 25]. Помимо собственного пролиферативного эффекта, IGF-1 способен стабилизировать HIF-1 $\alpha$  путем активации p13K-Akt и вторично усиливать индукцию ростовых факторов [14].

Роль IGF-1 в развитии гипертрофии миокарда установлена в исследованиях на мышцах с кардиомиоцит-специфической гиперэкспрессией IGF-1r [12]. Рассматривается участие IGF-1 в патогенезе атеросклероза и сердечной недостаточности [10, 23]. Ишемическая кардиомиопатия у собак сопровождалась повышением экспрессии IGF-1 и IGF-1r, причем последняя коррелировала с ростом экспрессии циклинов B, D1, D3 и E систолической дисфункцией, в отличие от экспрессии TGF $\beta$  [32]. Ввиду специфичности роли IGF-1 в ремоделировании миокарда представляется важной детальная характеристика IGF-1-опосредованных механизмов во всех случаях функционально-структурной перестройки сердца в ответ на влияние физиологических или патологических стимулов.

Как показывают приведенные данные, множественные сигнальные пути могут опосредовать клеточные ответы в кардиомиоцитах на активацию одного рецептора, и наоборот, сигналы от разных рецепторов часто объединяются в единый киназный каскад с типичным клеточным ответом, что значительно затрудняет интерпретацию роли тех или иных факторов в развитии ремоделирования и адаптации. Это привело к механистическому выделению в ряде работ отдельных рецепторных и киназных путей, которые приводят, по мнению авторов, к «физиологической» или «патологической» гипертрофии миокарда, и даже делению гипоксии как действующего фактора на «физиологическую гипоксию» и «патологическую гипоксию» [12, 18]. Не поддерживая этот поверхностный подход, мы полагаем, что взаимодействие различных сигнальных путей происходит во всех случаях их активации, а конечный эффект зависит от степени повреждения и совокупности регуляторных воздействий. При этом существование стресс-реактивных механизмов защиты необходимо для экстренного обеспечения выживания

клеток, хотя их хроническая или чрезмерная стимуляция может становиться повреждающей и приводить к развитию патологических изменений.

Хорошо иллюстрирует этот тезис феномен гипоксического preconditionирования (ГП), который можно закономерно рассматривать как срочную адаптацию к гипоксии [1—3]. В 2002 г. нами и группой L. Xi с соавторами была независимо разработана модель ГП миокарда с помощью действия 10% O<sub>2</sub> в течение 3 ч у крыс [3—5] и 4 ч у мышей [57]. Индукция генов в миокарде через 24 ч после действия острой гипоксии обеспечивает защиту от ишемического повреждения в течение 3 сут. Среди протекторных эффектов гипоксического preconditionирования миокарда (ГП) можно выделить уменьшение размера инфаркта, предупреждение развития реперфузионных аритмий, улучшение сократительной функции сердца (рис. 1), что обеспечивается функцией индуцибельных белков (iNOS, COX-2) и активацией Ca<sup>2+</sup>-зависимых и АТФ-зависимых калиевых каналов [3—5]. Вместе с тем, хорошо известно, что чрезмерная функция iNOS и COX-2 является повреждающей. В связи с этим, мы полагаем, что в результате ГП индуцируются также механизмы, позволяющие быстро ограничивать функцию этих стресс-реактивных белков.

Другим важным моментом является тот факт, что после ГП не развивается ремоделирование миокарда. Однако при действии хронической гипоксии хорошо известно развитие гипертрофии правого желудочка сердца [18], которое мы наблюдали в популяции крыс Вистар, содержащихся на высоте 2100 м в Приэльбрусье (рис. 2). Ввиду недостаточной изученности особенностей этих адаптивных процессов и их молекулярных механизмов мы провели исследования

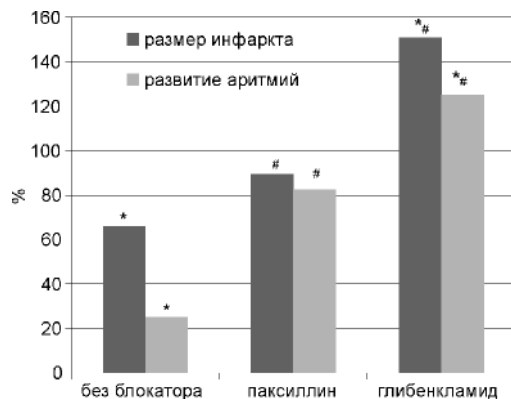


Рис. 1. Размер инфаркта и развитие реперфузионных аритмий в изолированном сердце крыс через 24 ч после гипоксического preconditionирования (10% O<sub>2</sub>, 3 ч) и при блокаде K<sub>Ca2+</sub>-каналов паксиллином и K<sub>ATP</sub>-каналов глибенкламидом (% от показателей контрольной группы). \*P<0,05 по сравнению с контрольной группой; #P<0,05 по сравнению с группой без блокатора

экспрессии ряда генов и белков в миокарде равнинных и горных крыс при проведении у них ГП.

Можно отметить, что индукция IGF-1 после ГП происходила только в правых желудочках равнинных крыс (рис. 3, А), а у горных крыс экспрессия этого гена в миокарде была значительно супрессирована и не повышалась в ответ на ГП [6, 41]. Формирование таких особенностей могло быть обусловлено достижением адаптированного состояния сердца животных, когда его дальнейшее ремоделирование должно быть ограничено. Вместе с тем, наблюдали рост экспрессии белков семейства HSP70 в сердце адаптированных животных [3] и значительный рост их экспрессии при ГП, чего не происходило на равнине (рис. 3, Б). Учитывая стабилизирующее действие этих белков на HIF-1α и их функции шаперонов при индукции генов-мишеней, следовало бы ожидать, напротив, активации клеточного роста у горных крыс. При определении экспрессии мРНК HIF-1α и HIF-3α в миокарде наблюдался их рост [41], однако соотношение экспрессии этих субъединиц (HIF-3α/HIF-1α) претерпевало значительные изменения (рис. 3, В), увеличиваясь в 7,8 раза в левом и в 4,7 раза в правом желудочке по сравнению с равнинными животными. Таким образом, преимущественное увеличение экспрессии HIF-3α в миокарде горных крыс могло оказывать ингибиторное действие на HIF-1α — опосредованную индукцию факторов роста, в частности, IGF-1.

При изучении динамики ответа фактора роста на ГП у адаптированных крыс мы все же отметили транзитное повышение его экспрессии на 3 сутки после ГП в правом желудочке, и на 5-е сутки — в левом (рис. 4, А). Белок-синергист HSP60, поддерживающий функцию IGF-1r, увеличивал свою экспрессию

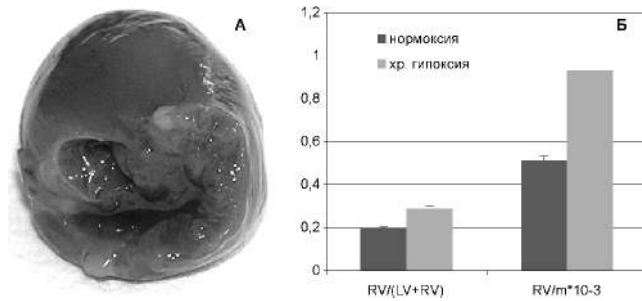


Рис. 2. А — гипертрофия правого желудочка сердца крыс при действии хронической гипоксии на высоте 2100 м; Б — соотношение массы правого желудочка сердца к массе обоих желудочков (RV/(LV+RV), мг/мг) и массе тела (RV/m, мг/г) у крыс на равнине и на высоте 2100 м



рессию в этот же срок в правом желудочке (рис. 4, Б). Таким образом, наблюдалась умеренная транзиторная активация адаптивных механизмов, связанных с IGF-1, более выраженная в правом желудочке сердца. Для сравнения, экспрессия белка bFGF, связанного с пролиферацией фибробластов и ремоделированием внеклеточного матрикса, не только не индуцировалась после ГП, но и претерпевала супрессию в правом желудочке (рис. 4, В).

Представленные результаты подтверждают сделанное нами предположение о наличии жесткой ограничительной регуляции HIF-1 $\alpha$  — опосредованного адаптивного ответа при гипоксических состояниях. При острой гипоксии (ГП) не происходит запуска ремоделирования миокарда, а индукция факторов роста носит транзиторный характер. При хронической гипоксии процесс ремоделирования ограничивается по достижению оптимального функционирования, при-

чем экспрессия факторов роста поддерживается на значительно редуцированном уровне, а их реактивность на ГП значительно уменьшается. Вместе с тем, паттерн регуляторных генов и белков, которые влияют на функцию системы HIF, изменяется в зависимости от гипоксического режима, обеспечивая тонкую настройку функционирования этой системы и достижение оптимальной адаптации к гипоксии.

### Заключение

Результаты современных исследований значительно развивают и дополняют теорию гипоксического сенсинга, опосредованного HIF, и его роль в адаптации миокарда к гипоксическим условиям. Регуляция экспрессии и функции HIF осуществляется множественными механизмами с наличием значительного количества путей обратной положительной и отрицательной регуляции. Такая сеть регуляторных путей свидетельствует об особой значимости

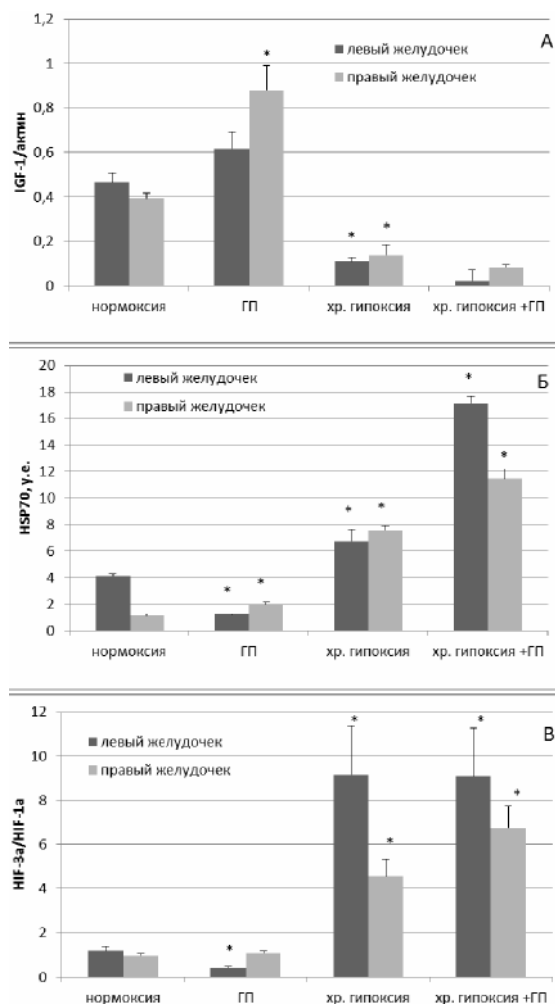


Рис. 3. Экспрессия мРНК IGF-1 (А), белка HSP70 (Б) и соотношение экспрессии мРНК HIF-3 $\alpha$  и HIF-1 $\alpha$  в сердце крыс при влиянии различных режимов гипоксии. \*P<0,05 по сравнению с показателями при нормоксии

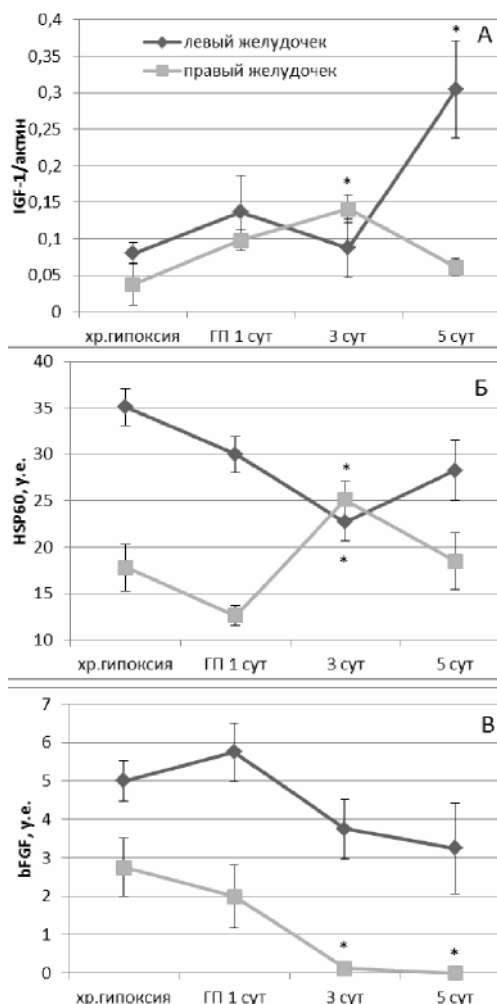


Рис. 4. Экспрессия мРНК IGF-1 (А), белка HSP60 (Б) и белка bFGF (В) в сердце крыс в динамике после гипоксического preconditionирования. \*P<0,05 по сравнению с исходными показателями

HIF-опосредованных механизмов для поддержания внутриклеточного гомеостаза и тщательности их регулирования в зависимости от его параметров.

Факторы роста как мишени действия HIF обладают рядом неспецифических и специфических эффектов. Помимо их общего действия, направленного на обеспечение выживания клеток, они проявляют антиапоптотический эффект, а также потенцируют вторичную индукцию факторов роста, стабилизируя HIF. Эти эффекты, как правило, опосредованы действием через киназы PI3K-Akt. Наряду с потенциацией пролиферативного ответа, активация HIF приводит и к индукции ингибиторов, что позволяет тщательно контролировать пролиферативный ответ. Вместе с тем, особенности действия факторов роста в индукции ангиогенеза, пролиферации или миграции клеточных популяций могут быть обусловлены как сочетанным действием на различные рецепторы и/или сигнальные пути, так и влиянием регуляторов, в том числе NO и свободнорадикальных молекул.

Гипоксическое прекондиционирование как срочная фаза адаптации к гипоксии максимум своего эффекта проявляет в индукции регуляторов вазодилатации и свободнорадикальных процессов в миокарде, активации калиевых каналов митохондрий и модуляции функции последних. Индукция факторов роста в миокарде является более отсроченной и тщательно регулируется в каждом желудочке сердца в зависимости от нагрузки на него, в норме их действие проявляется транзиторно, до достижения адаптации. Хроническая гипоксия в здоровом организме должна приводить к нарастающей индукции ингибиторных механизмов и в итоге к глубокому подавлению пролиферативного ответа в миокарде, что предупреждает неконтролируемое ремоделирование и развитие сердечной недостаточности.

Адаптация миокарда к хронической гипоксии и гипоксическое ремоделирование сердца сопровождаются значительным повышением соотношения экспрессии мРНК HIF-3 $\alpha$ /HIF-1 $\alpha$ , что ограничивает функцию последней, редукцией IGF-1 — опосредованной метаболической и тканевой перестройки, интенсификацией экспрессии шаперонов. Эти молекулярные изменения в адаптированном сердце повышают защиту миокарда от гипоксического повреждения и поддерживают его более высокую функциональную нагрузку при гипоксии.

### Список литературы

1. Лукьянова Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции // Патол. физиол. и эксп. терапия. — 2011. — №1. — С. 2—18.
2. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И., Сукоян Г.В. Новое о сигнальных механизмах адаптации к гипоксии и их роли в системной регуляции // Патогенез. — 2011. — Т. 9, №3. С. 4—14.
3. Портниченко А.Г. Феномен позднего прекондиционирования миокарда, или фенотипическая кардиопротекция // Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца / Под ред. А.А. Мойбенко, В.Е. Досенко, А.Н. Пархоменко. — К.: НВП «Видавництво «Наукова думка» НАН України», 2008. — С. 305—331.
4. Портниченко А.Г., Василенко М.И., Мойбенко А.А. Роль калиевых каналов в эффекторных механизмах кардиопротекции при позднем прекондиционировании сердца крысы // Патология. — 2008. — Т. 5, №3. — С. 61—62.
5. Портниченко А.Г., Василенко М.И., Портниченко В.И., Мойбенко А.А. Острая гипоксическая гипоксия как индуктор отсроченной кардиопротекции у крыс // Гипоксия, автоматизированный анализ гипоксических состояний. Сб. трудов под ред. А.З. Колчинской. — Москва — Нальчик, 2005. — Т. 1. — С. 185—190.
6. Портниченко В.И., Портниченко А.Г., Суровая О.В. Гипогликемия и индукция генов в миокарде и легких крыс при гипобарической гипоксии // Здобутки кліні. і експерим. медицини. — 2009. — №2. — С. 43—46.
7. Agbor T.A., Cheong A., Comerford K.M. et al. Small ubiquitin-related modifier (SUMO)-1 promotes glycolysis in hypoxia // J. Biol. Chem. — 2011. — Vol. 286, №6. — P. 4718—4726.
8. An X., Jin Y., Guo H. et al. Response gene to complement 32, a novel hypoxia-regulated angiogenic inhibitor // Circulation. — 2009. — Vol. 120, №7. — P. 617—627.
9. Andre H., Pereira T.S. Identification of an alternative mechanism of degradation of the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  // J. Biol. Chem. — 2008. — Vol. 283, №43. — P. 29375—29384.
10. Andreassen M., Raymond I., Kistorp C. et al. IGF1 as predictor of all cause mortality and cardiovascular disease in an elderly population // Eur. J. Endocrinol. — 2009. — Vol. 160, №1. — P. 25—31.
11. Berchner-Pfannschmidt U., Tug S., Kirsch M., Fandrey J. Oxygen-sensing under the influence of nitric oxide // Cell Signal. — 2010. — Vol. 22, №3. — P. 349—356.
12. Bernardo B.C., Weeks K.L., Pretorius L., McMullen J.R. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies // Pharmacol. Ther. — 2010. — Vol. 128, №1. — P. 191—227.
13. Burger D., Xenocostas A., Feng Q.P. Molecular basis of cardioprotection by erythropoietin // Curr. Mol. Pharmacol. — 2009. — Vol. 2, №1. — P. 56—69.
14. Carroll V.A., Ashcroft M. Role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  versus HIF-2 $\alpha$  in the regulation of HIF target genes in response to hypoxia, insulin-like growth factor-1, or loss of von Hippel-Lindau function: implications for targeting the HIF pathway // Cancer Res. — 2006. — Vol. 66, №12. — P. 6264—6270.
15. Chen J.X., Stinnett A. Ang-1 gene therapy inhibits hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )-prolyl-4-hydroxylase-2, stabilizes HIF-1 $\alpha$  expression, and normalizes immature vasculature in db/db mice // Diabetes. — 2008. — Vol. 57, №12. — P. 3335—3343.
16. Chua Y.L., Dufour E., Dassa E.P. et al. Stabilization of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  protein in hypoxia occurs independently of mitochondrial reactive oxygen species production // J. Biol. Chem. — 2010. — Vol. 285, №41. — P. 31277—31284.
17. Connor K.M., Subbaram S., Regan K.J. et al. Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regulates the angiogenic phenotype via PTEN oxidation // J. Biol. Chem. — 2005. — Vol. 280, №17. — P. 16916—16924.

18. **Essop M.F.** Cardiac metabolic adaptations in response to chronic hypoxia // *J. Physiol.* — 2007. — Vol. 584(Pt 3). — P. 715–726.
19. **Fong G.H., Takeda K.** Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins // *Cell Death Differ.* — 2008. — Vol. 15, №4. — P. 635–641.
20. **Gu Y.Z., Moran S.M., Hogenesch J.B.** et al. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha // *Gene Expr.* — 1998. — Vol. 7, №3. — P. 205–213.
21. **Hara S., Hamada J., Kobayashi C.** et al. Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3 $\alpha$  in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3 $\alpha$  // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2001. — Vol. 287. — P. 808–813.
22. **Heidbreder M., Frohlich F., Jöhren O.** et al. Hypoxia rapidly activates HIF-3alpha mRNA expression // *FASEB J.* — 2003. — Vol. 17, №11. — P. 1541–1543.
23. **Higashi Y., Sukhanov S., Anwar A.** et al. IGF-1, oxidative stress and atheroprotection // *Trends Endocrinol. Metab.* — 2010. — Vol. 21, №4. — P. 245–254.
24. **Jiang B.H., Rue E., Wang G.L.** et al. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1 // *J. Biol. Chem.* — 1996. — Vol. 271. — P. 17771–17778.
25. **Johansson G.S., Arneqvist H.J.** Insulin and IGF-I action on insulin receptors, IGF-I receptors, and hybrid insulin/IGF-I receptors in vascular smooth muscle cells // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* — 2006. — Vol. 291, №5. — P. E1124–E1130.
26. **Jung S.N., Yang W.K., Kim J.** et al. Reactive oxygen species stabilize hypoxia-inducible factor-1 alpha protein and stimulate transcriptional activity via AMP-activated protein kinase in DU145 human prostate cancer cells // *Carcinogenesis.* — 2008. — Vol. 29, №4. — P. 713–721.
27. **Kimura H., Esumi H.** Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis // *Acta Biochim. Pol.* — 2003. — Vol. 50, №1. — P. 49–59.
28. **Koehl R., Zhou J., Brune B.** Reactive oxygen species attenuate nitric-oxide-mediated hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization // *Radic. Biol. Med.* — 2006. — Vol. 40, №8. — P. 1430–1442.
29. **Li N., Lu X., Zhao X.** et al. Endothelial nitric oxide synthase promotes bone marrow stromal cell migration to the ischemic myocardium via upregulation of stromal cell-derived factor-1alpha // *Stem Cells.* — 2009. — Vol. 27, №4. — P. 961–970.
30. **Liu Y.V., Baek J.H., Zhang H.** et al. RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha // *Mol. Cell.* — 2007. — Vol. 25, №2. — P. 207–217.
31. **Liu Y.V., Hubbi M.E., Pan F.** et al. Calcineurin promotes hypoxia-inducible factor 1alpha expression by dephosphorylating RACK1 and blocking RACK1 dimerization // *J. Biol. Chem.* — 2007. — Vol. 282, №51. — P. 37064–37073.
32. **Mahmoudabady M., Mathieu M., Touihri K.** et al. Cardiac insulin-like growth factor-1 and cyclins gene expression in canine models of ischemic or overpacing cardiomyopathy // *BMC Cardiovasc. Disord.* — 2009. — Vol. 9. — P. 49–55.
33. **Makino Y., Kanopka A., Wilson W.J.** et al. IPAS is an hypoxia-inducible splicing variant of the HIF-3 $\alpha$  locus // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277. — P. 32405–32408.
34. **Maynard M.A., Evans A.J., Hosomi T.** et al. Human HIF-3 $\alpha$  4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma // *The FASEB Journal.* — 2005. — Vol. 19. — P. 1396–1406.
35. **Mazure N.M., Brahimi-Horn M.C., Pouyssegur J.** Protein kinases and the hypoxia-inducible factor-1, two switches in angiogenesis // *Curr. Pharm. Des.* — 2003. — Vol. 9, №7. — P. 531–541.
36. **McMahon S., Charbonneau M., Grandmont S.** et al. Transforming growth factor beta1 induces hypoxia-inducible factor-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression // *J. Biol. Chem.* — 2006. — Vol. 281, №34. — P. 24171–24181.
37. **Messmer-Blust A., An X., Li J.** Hypoxia-regulated angiogenic inhibitors // *Trends Cardiovasc. Med.* — 2009. — Vol. 19, №8. — P. 252–256.
38. **Naranjo-Suarez S., Carlson B.A., Tsuji P.A.** et al. HIF-Independent Regulation of Thioredoxin Reductase 1 Contributes to the High Levels of Reactive Oxygen Species Induced by Hypoxia // *PLoS One.* — 2012. — Vol. 7, №2. — e30470–e3477.
39. **Osol G., Celia G., Gokina N.** et al. Placental growth factor is a potent vasodilator of rat and human resistance arteries // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2008. — Vol. 294, №3. — H1381–H1387.
40. **Passeri J., Bloch K.D.** Nitric Oxide and Cardiac Remodeling // *Heart Failure Clinics.* — 2005. — Vol. 1, №2. — P. 275–286.
41. **Portnychenko A.G., Dosenko V.E., Portnichenko V.I., Moybenko O.O.** Expression of HIF-1 $\alpha$  and HIF-3 $\alpha$  differentially changed in rat heart ventricles after hypoxic preconditioning // *Proc. of XXVIII ESc Meeting of the ISHR, Athens, Greece, May 28–31, 2008.* — *Medimond Intern. Proc.*, 2008. — P. 61–64.
42. **Portnychenko A.G., Drevyts'ka T.I., Sydorenko A.M., Portnichenko V.I.** Expression of IGF-1 in heart and lungs of rats under hypoxic preconditioning or periodic hypoxia influence // *VI Ann. Ukrainian-Polish Conf. «Current aspects of lung diseases: Pathophysiology, diagnostics, treatment».* — Ternopil, Ukraine, 24–25 September 2009. — P. 102–103.
43. **Pugh C.W., Ratcliffe P.J.** Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system // *Nat. Med.* — 2003. — Vol. 9. — P. 677–684.
44. **Sasabe E., Yang Z., Ohno S., Yamamoto T.** Reactive oxygen species produced by the knockdown of manganese-superoxide dismutase up-regulate hypoxia-inducible factor-1alpha expression in oral squamous cell carcinoma cells // *Free Radic. Biol. Med.* — 2010. — Vol. 48, №10. — P. 1321–1329.
45. **Sato Y., Sonoda H.** The vasohibin family: a negative regulatory system of angiogenesis genetically programmed in endothelial cells // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2007. — Vol. 27, №1. — P. 37–41.
46. **Semenza G.L.** Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway // *Sci. STKE.* — 2007. — Iss. 407. — cm8.
47. **Shao R., Zhang F.P., Tian F.** et al. Increase of SUMO-1 expression in response to hypoxia: direct interaction with HIF-1alpha in adult mouse brain and heart in vivo // *FEBS Lett.* — 2004. — Vol. 569, №1–3. — P. 293–300.
48. **Spinella F., Rosano L., Del Duca M.** et al. Endothelin-1 inhibits prolyl hydroxylase domain 2 to activate hypoxia-inducible factor-1alpha in melanoma cells // *PLoS One.* — 2010. — Vol. 5, №6. — e11241–e11246.
49. **Stahmann N., Woods A., Spengler K.** et al. Activation of AMP-activated protein kinase by vascular endothelial growth factor mediates endothelial angiogenesis independently of nitric-oxide synthase // *J. Biol. Chem.* — 2010. — Vol. 285, №14. — P. 10638–10652.
50. **Su K.H., Shyue S.K., Kou Y.R.** et al.  $\beta$  Common receptor integrates the erythropoietin signaling in activation of

- endothelial nitric oxide synthase // *J. Cell Physiol.* — 2011. — Vol. 226, №12. — P. 3330—3339.
51. **Tamareille S., Ghaboura N., Treguer F.** et al. Myocardial reperfusion injury management: erythropoietin compared with postconditioning // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2009. — Vol. 297, №6. — H2035—H2043.
52. **Urano T., Ito Y., Akao M.** et al. Angiopoietin-related growth factor enhances blood flow via activation of the ERK1/2-eNOS-NO pathway in a mouse hind-limb ischemia model // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2008. — Vol. 28, №5. — P. 827—834.
53. **van de Sluis B., Groot A.J., Vermeulen J.** et al. COMMD1 Promotes pVHL and O<sub>2</sub>-Independent Proteolysis of HIF-1alpha via HSP90/70 // *PLoS One.* — 2009. — Vol. 4, №10. — e7332—e7338.
54. **van Hagen M., Overmeer R.M., Abolvardi S.S.** et al. RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2alpha // *Nucleic Acids Res.* — 2010. — Vol. 38, №6. — P. 1922—1931.
55. **Wilkins S.E., Karttunen S., Hampton-Smith R.J.** et al. Factor inhibiting HIF (FIH) recognises distinct molecular features within hypoxia inducible factor (HIF)- $\alpha$  versus ankyrin repeat substrates // *J. Biol. Chem.* — 2012. — Vol. 287, №12. — P. 8769—8781.
56. **Wu G., Mannam A.P., Wu J.** et al. Hypoxia induces myocyte-dependent COX-2 regulation in endothelial cells: role of VEGF // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2003. — Vol. 285, №6. — H2420—H2429.
57. **Xi L., Tekin D., Gursoy E.** et al. Evidence that NOS2 acts as a trigger and mediator of late preconditioning induced by acute systemic hypoxia // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2002. — Vol. 283, №1. — H5—H12.
58. **Xu X.H., Xu J., Xue L.** et al. VEGF attenuates development from cardiac hypertrophy to heart failure after aortic stenosis through mitochondrial mediated apoptosis and cardiomyocyte proliferation // *J. Cardiothorac. Surg.* — 2011. — Vol. 16, №6. — P. 54—60.
59. **Yee Koh M., Spivak-Kroizman T.R., Powis G.** HIF-1 regulation: not so easy come, easy go // *Trends Biochem. Sci.* — 2008. — Vol. 33, №11. — P. 526—534.
60. **Zhao X., Lu X., Feng Q.** Deficiency in endothelial nitric oxide synthase impairs myocardial angiogenesis // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2002. — Vol. 283, №6. — H2371—H2378.
61. **Zhou J., Schmid T., Frank R., Brune B.** PI3K/Akt is required for heat shock proteins to protect hypoxia-inducible factor 1alpha from pVHL-independent degradation // *J. Biol. Chem.* — 2004. — Vol. 279, №14. — P. 13506—13513.

Поступила 16.09.12

© Коллектив авторов, 2012  
УДК 613.863.07:575.112.612.017.2

Л.М. Белкина<sup>1</sup>, Е.А. Смирнова<sup>1</sup>, М.В. Шимкович<sup>1</sup>, О.Л. Терехина<sup>1</sup>,  
А.В. Горячева<sup>1</sup>, Д.А. Чепурнова<sup>1</sup>, Г.Ф. Дауни<sup>2</sup>, Р.Т. Маллет<sup>2</sup>, Е.Б. Манухина<sup>1,2</sup>

## Кардиопротекторный эффект адаптации к периодической нормобарической гипоксии у крыс

<sup>1</sup> ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, Москва

<sup>2</sup> Медицинский факультет Университета Северного Техаса, Форт-Уэрт, США

Защитное действие адаптации к периодической нормобарической гипоксии (АПНГ) при ишемических повреждениях сердечно-сосудистой системы изучено недостаточно. В данной работе изучали на крысах влияние предварительной АПНГ на размеры ишемического некроза и интенсивность аритмий, вызванных *in situ* перевязкой левой коронарной артерии на 30 мин с последующей 60-минутной реперфузией. АПНГ заключалось в вдыхании гипоксической газовой смесью (9,5–10% O<sub>2</sub>) в течение 5–10 мин с 4-минутными интервалами нормоксии (по 5–8 циклов ежедневно) в течение 21 дня. После завершения реперфузии сердца перфузировали 2%-ным раствором красителя синего Эванса, чтобы отличить зону риска инфаркта от нормальной ткани. Затем разрезали на поперечные срезы и инкубировали в 1%-ном растворе трифенилтетразолия хлорида, что позволяло отличить зону инфаркта от зоны риска. АПНГ уменьшала частоту и длительность ишемических, но не реперфузионных аритмий, а также уменьшала на 42% размеры ишемических некрозов.

**Ключевые слова:** адаптация, нормобарическая гипоксия, инфаркт миокарда, сердечные аритмии

L.M. Belkina<sup>1</sup>, E.A. Smirnova<sup>1</sup>, M.V. Shimkovich<sup>1</sup>, O.L. Terechina<sup>1</sup>,  
A.V. Goryacheva<sup>1</sup>, D.A. Chepurnova<sup>1</sup>, H.F. Downey<sup>2</sup>, R.T. Mallet<sup>2</sup>, E.B. Manukhina<sup>1,2</sup>

## Cardioprotective effect of the adaptation to periodic normobaric hypoxia in rats

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

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

Intermittent hypoxic conditioning (IHC) may provide novel, non-invasive cardioprotection against ischemia-reperfusion (IR) damage. In the current study, rats were subjected to normobaric IHC (5–8 cycles/d for 20 days, FIO<sub>2</sub> 9.5–10% for 5–10 min/cycle, with intervening 4 min normoxia), a regimen that may have clinical applications. Control rats were sham-conditioned with 21% O<sub>2</sub>. Ischemia was produced *in situ* by ligation of the left coronary artery for 30 min, followed by 60-min reperfusion, while arrhythmias were monitored. Hearts were excised, perfused with Evans blue dye (area at risk, AR) and then stained with triphenyltetrazolium chloride (infarct size, IS). AR and IS were planimetrically measured, and IS was expressed as %AR. IHC reduced the frequency and duration of ischemic, but not reperfusion arrhythmias, and the adaptation also reduced by 42% the sizes of ischemic necroses. Thus, IHC possesses the antiarrhythmic and cytoprotective action.

**Key words:** adaptation, normobaric hypoxia, myocardial infarction, heart arrhythmias

Сердечно-сосудистые реакции на длительную периодическую гипоксию неоднозначны и зависят от режима гипоксических воздействий. Так, известно, что тяжелая периодическая гипоксия, характерная для апноэ во сне, способствует развитию гипертензии и повышает риск ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда [22]. Однако умеренная периодическая гипоксия обладает кардио- и вазопротекторным действием [11, 17]. В эксперименте и в клинике показано, что адаптация организма к периодической гипобарической гипоксии, создаваемая в барокамере, об-

ладает антиаритмическим эффектом [4, 19], снижает артериальное давление при гипертензии [2, 23], используется при реабилитации пациентов, перенесших аортокоронарное шунтирование [1], и предупреждает дисфункцию эндотелия у животных с экспериментальной гипертензией [1, 3].

В то же время экспериментальных данных о защитных эффектах периодической нормобарической гипоксии на сердечно-сосудистую систему и механизмах ее действия значительно меньше, хотя в настоящее время этот вид гипоксии более широко, чем гипобарическая гипоксия, используется в клинике для лечения артериальной гипертензии и других сердечно-сосудистых заболеваний [23], а также при трени-

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

ровках спортсменов [8]. На собаках были получены первые данные, свидетельствующие о том, что периодическая нормобарическая гипоксия может ограничивать развитие ишемических и реперфузионных повреждений миокарда [25].

Цель исследования состояла в изучении возможности ограничения зоны ишемического поражения и аритмий в условиях острой ишемии и реперфузии (ИР) миокарда у крыс путем предварительной адаптации к нормобарической периодической гипоксии.

### Методика

Эксперименты выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 250—280 г. Использовано 4 группы животных:

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

Адаптацию к периодической нормобарической гипоксии (АПНГ) проводили в гипоксической камере циклами. Каждый цикл состоял в дыхании гипоксической газовой смесью (9,5—10% O<sub>2</sub>) в течение 5—10 мин, чередуя с дыханием атмосферным воздухом в течение 4 мин. Каждый сеанс адаптации состоял из 5—8 циклов ежедневно. Полный курс адаптации длился 21 день. Контрольные животные находились в тех же условиях, при которых проводилась адаптация к гипоксии, в течение 21 дня, но вместо гипоксической газовой смеси дышали атмосферным воздухом.

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

Сразу после окончания периода реперфузии сердце извлекали, отмывали от крови, перфузировали через аорту 2%-ным раствором красителя синего Эванса, что позволяет отличить в левом желудочке зону риска инфаркта от окружающей нормальной ткани, которая приобретает синюю окраску. После этого сердце замораживали при -20°C в течение 20 мин и разрезали на 5—6 поперечных срезов толщиной 2 мм. Срезы инкубировали в 1%-ном растворе трифенилтетразолия хлорида в фосфатном буфере (рН=7,4) в течение 20 мин при температуре 37°C. Это позволяет отличить зону инфаркта (зону ишемии), которая остается светлой, от зоны риска, которая приобретает красную окраску. Срезы фиксировали в 10%-ном растворе формальдегида и фотографировали. Зону инфаркта и зону риска измеряли с помощью компьютерной планиметрии и рассчитывали величину зоны инфаркта в процентах от зоны риска. Данные представлены как среднее ± SEM. Для статистической обработки результатов использовали критерий Вилкоксона—Манна—Уитни (критерий U) и критерий  $\chi^2$ .

### Результаты и обсуждение

Адаптация к гипоксии сама по себе не вызывала достоверных изменений относительной массы правого желудочка (таблица), т.е. при данном режиме периодической гипоксии правожелудочковая гипертрофия отсутствовала. Частота сердечных сокращений между группами также достоверно не различалась (358±10 уд./мин в контроле, 352±15 уд./мин после адаптации,  $p>0,05$ ).

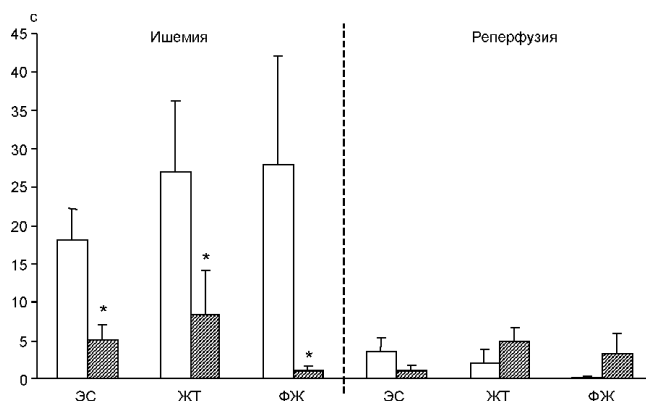
На рис. 1 приводится суммарная длительность разных видов аритмии во время ишемии миокарда. Видно, что длительность ишемической экстрасистолии, желудочковой тахикардии и желудочковой фибрилляции у крыс, предварительно адаптированных к гипоксии, была достоверно меньше, чем у неадаптированных животных. Однако адаптация к гипоксии не влияла на длительность реперфузионных аритмий.

Аналогичная закономерность наблюдалась при сопоставлении частоты случаев аритмий: у адаптированных к гипоксии аритмии всех видов во время ишемии наблюдались реже, чем у неадаптированных крыс (рис. 2). Однако в отношении реперфузионных аритмий защитный эффект адаптации также отсутствовал.

Таблица

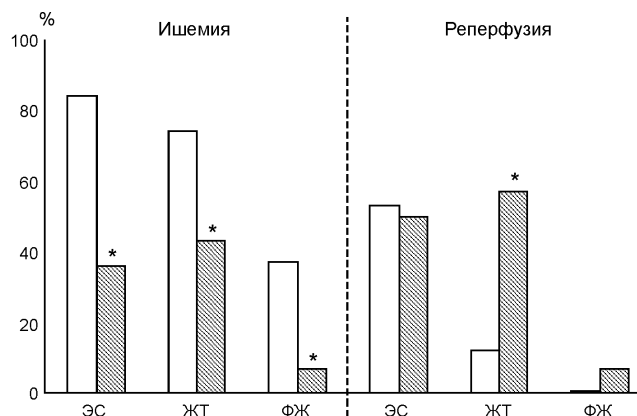
Влияние адаптации к гипоксии на относительную массу правого желудочка у крыс (МПЖ = масса правого желудочка, г; МЛЖ = масса левого желудочка, г; МТ = масса тела)

	МТ, г	МПЖ / (МПЖ + МЛЖ)	МПЖ / МТ
Контроль	314±31	0,23±0,03	0,00061±0,00008
Адаптация к гипоксии	342±16	0,22±0,03	0,00064±0,00008



**Рис. 1.** Влияние адаптации к периодической нормобарической гипоксии на длительность аритмий во время ишемии и реперфузии миокарда крысы.

По вертикали — длительность аритмий в секундах. Белые столбики — контроль, заштрихованные — адаптация к гипоксии. Здесь и на рис. 2 и 3: ЭС — экстрасистолия; ЖТ — желудочковая тахикардия; ФЖ — фибрилляция желудочков. \* —  $p < 0,05$  — статистически значимые различия между адаптацией и контролем (по критерию  $\chi^2$ )



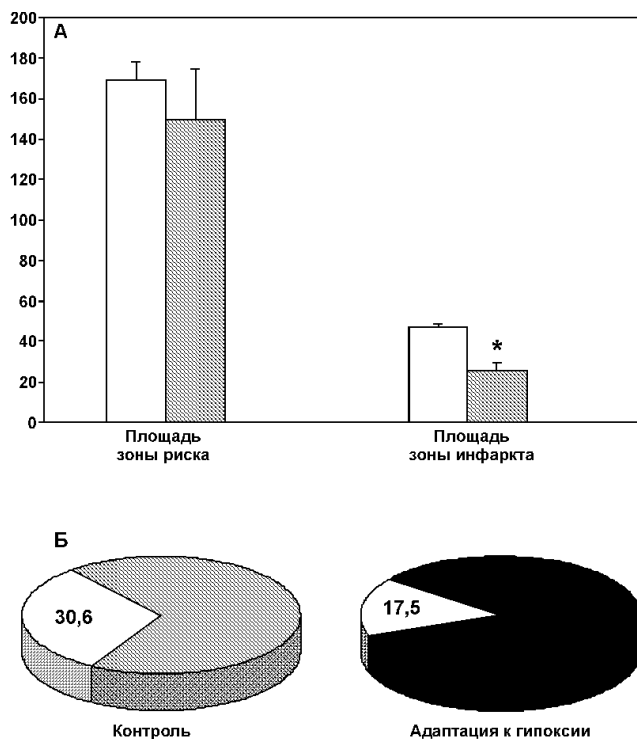
**Рис. 2.** Влияние адаптации к периодической нормобарической гипоксии на частоту развития аритмий во время ишемии и реперфузии миокарда крысы.

По вертикали — количество животных с аритмиями в процентах от общего числа животных, взятого за 100%. Остальные обозначения как на рис. 1. \* —  $p < 0,05$  — статистически значимые различия между адаптацией и контролем (по критерию  $\chi^2$ ).

Сравнение величины зоны инфаркта и зоны риска после 1 ч реперфузии (рис. 3) показало, что у неадаптированных крыс величина зоны инфаркта составляла от величины зоны риска  $30,6 \pm 4,6\%$ , а у адаптированных к гипоксии животных  $17,7 \pm 3,5\%$ , т.е. почти вдвое больше ( $p < 0,05$ ). В то же время абсолютная величина зоны риска у адаптированных и неадаптированных крыс достоверно не различалась и составляла соответственно  $26,8 \pm 1,4$  и  $30,1 \pm 1,6\%$  от площади среза левого желудочка сердца.

Главный результат настоящего исследования состоит в том, что предварительная адаптация к нормобарической гипоксии оказывает достоверное кардиопротекторное действие при ИР повреждении сердца, которое проявляется в уменьшении интенсивности ишемических аритмий и ограничении размера инфаркта миокарда.

Многочисленные данные свидетельствуют о выраженном антиаритмическом и цитопротекторном эффекте гипоксического или ишемического прекондиционирования [10, 14]. Возможные механизмы, лежащие в его основе, широко изучаются и включают индукцию фактора HIF-1 $\alpha$  [7], активацию синтеза оксида азота [5],  $\beta$ -адренергических механизмов [15]. Некоторые механизмы гипоксического или ишемического прекондиционирования могут быть общими с механизмами адаптации к гипоксии. Это подтверждается отсутствием аддитивного кардиопротекторного эффекта при применении комбинации адаптации и прекондиционирования [21]. Важно отметить, что защитный эффект гипоксического прекондиционирования сохраняется только 3—4 дня [13, 16], тогда как кардиопротекторный эффект, обусловленный адаптацией



**Рис. 3.** Влияние адаптации к гипоксии на площадь зоны инфаркта миокарда и зоны риска:

А — абсолютная величина зоны риска и зоны инфаркта в планиметрических единицах (по вертикали); Б — соотношение площади зоны риска и зоны инфаркта. Светлые сегменты — зона инфаркта, темные сегменты — зона риска. \* —  $p < 0,05$  — статистически значимые различия между адаптацией и контролем (по критерию U).

к периодической гипоксии, наблюдается более 35 дней [20]. Это указывает на наличие существенных различий в механизмах ишемического preconditionирования и адаптации к гипоксии, возможно, связанных с адаптивной активацией синтеза протекторных белков при долговременной адаптации [19]. Поэтому изучение защитных возможностей и механизмов долговременной адаптации к периодической нормобарической гипоксии представляет большой интерес.

Адаптация к периодической гипоксии успешно используется в эксперименте и клинике для предупреждения и лечения многих заболеваний, включая бронхиальную астму, аллергический нейродермит, гипертензию, сахарный диабет, паркинсонизм, эмоциональные расстройства, дислипидемию, параноидную форму шизофрении, радиационные повреждения, ряд профессиональных заболеваний, а также для повышения эффективности тренировки спортсменов [8, 19, 23]. Механизмы, лежащие в основе защитных, в частности, кардиопротекторных эффектов адаптации к нормобарической гипоксии недостаточно хорошо изучены. В то же время известно, что адаптация к гипобарической гипоксии индуцирует экспрессию протекторных белков и фактора HIF-1 $\alpha$ , стимулирует антиоксидантную защиту организма, стабилизирует клеточные мембраны, модулирует синтез оксида азота, активирует АТФ-чувствительные калиевые каналы, предупреждает открытие митохондриальных пор МРТР (mitochondrial permeability transition pore) при реперфузии, перегрузку клеток кальцием и улучшает транспорт кислорода в тканях. Кроме того, адаптация к гипоксии вызывает ряд благоприятных изменений в митохондриях, вовлекающих НАД-зависимый метаболизм, которые направлены на повышение эффективности утилизации кислорода при продукции АТФ [11, 17, 19, 24].

Важную роль в кардиопротекторном эффекте периодической гипоксии, по-видимому, играет фактор чередования периодов гипоксии и нормоксии. Было показано [6], что защитным эффектом при ИР повреждении обладает только preconditionирование умеренной (10% O<sub>2</sub>) периодической гипоксией, в то время как непрерывная гипоксия или более тяжелая (5% O<sub>2</sub>) периодическая гипоксия, напротив, увеличивают размер инфаркта миокарда [9]. Существует предположение, что в формирование кардиопротекции вносит вклад периодическая активация свободно-радикальных процессов, развивающихся в периоды возвращения от гипоксии к нормоксии, т.е. реоксигенации, поскольку антиоксиданты отменяют защитный эффект адаптации к гипоксии [12, 15]. Однако это предположение нуждается в дополнительных доказательствах.

В клинических исследованиях адаптация к нормобарической гипоксии оказывала антиаритмическое и антиангинальное действие у пациентов с ишемической болезнью сердца, которое превышало эффективность лекарственной терапии. Преимущество адаптации к гипоксии состояло в том, что при ее использовании не происходило угнетения сократительной функции миокарда и нарушения сердечной проводимости. В то же время адаптация к гипоксии обеспечивала более стабильный и продолжительный эффект, чем антиаритмические и антиангинальные препараты [18].

Экспериментальные данные, полученные в настоящем исследовании, подтверждают возможность клинического использования метода адаптации к периодической нормобарической гипоксии и показывают, что адаптация к гипоксии способна оказывать не только антиаритмический, но также и цитопротекторный эффект на сердце, подвергшееся действию ишемии и реперфузии.

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

### Список литературы

1. **Амирян В.Ю.** Особенности адаптации к условиям гипоксии на низкогорном курорте больных ИБС после аортокоронарного шунтирования // Терапевтический архив. — 1996. — Т. 68, №9. — С. 52–54.
2. **Лямина Н.П., Сенчихин В.Н., Покидышев Д.А., Манухина Е.Б.** Нарушение продукции NO у мужчин молодого возраста с артериальной гипертензией и немедикаментозный метод ее коррекции // Кардиология. — 2001. — №9. — С. 17–21.
3. **Манухина Е.Б., Мальшев И.Ю., Бувальцев В.И.** Эндотелиальная дисфункция и артериальная гипертензия: механизмы и пути коррекции // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. — 2003. — №4. — С. 26–30.
4. **Asemu G., Neckar J, Szarsoi O.** et al. Effects of adaptation to intermittent high altitude hypoxia on ischemic ventricular arrhythmias in rats // Physiol. Res. — 2000. — Vol. 49, №5. — P. 597–606.
5. **Baker C.S., Kumar S., Rimoldi O.E.** Effects of brief ischemia and reperfusion on the myocardium and the role of nitric oxide // Heart Fail Rev. — 2003. — Vol. 8, №2. — P. 127–141.
6. **Beguin P.C., Joyeux-Faure M., Godin-Ribuot D.** et al. Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia // J. Appl. Physiol. — 2005. — Vol. 99, №3. — P. 1064–1069.
7. **Cai Z., Bosch-Marce M, Fox-Talbot K.** et al. Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 alpha // Cardiovasc. Res. — 2008. — Vol. 77, №3. — P. 463–470.
8. **Dufour S.P., Ponsot E, Zoll J.** et al. Exercise training in normobaric hypoxia in endurance runners. I. Improvement in aerobic performance capacity // J. Appl. Physiol. — 2006. — Vol. 100, №4. — P. 1238–1248.
9. Chronic intermittent hypoxia increases infarction in the isolated rat heart // J. Appl Physiol. — 2005. — Vol. 98. — P. 1691–1696.



10. **Kharbanda R.K.** Cardiac conditioning: a review of evolving strategies to reduce ischaemia-reperfusion injury // *Heart*. — 2010. — Vol. 96, №15. — P. 1179–1186.
11. **Kolar F., Ostadal B.** Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia // *Physiol. Res.* — 2004. — Vol. 53. — S3–S13.
12. **Kolar F., Szarszoi O., Neckar J., Ostadal B.** Improved cardiac ischemic tolerance in rats adapted to chronic hypoxia is reduced by stimulation treatment with N-acetylcysteine // *Eur. J. Heart Fail.* — 2003. — Suppl 2/1. — P. 46.
13. **Kuzuya T., Hoshida S, Yamashita N.** et al. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia // *Circ. Res.* — 1993. — Vol. 72. — P. 1293–1299.
14. **Lochner A., Marais E., Genade S.** et al. Protection of the ischaemic heart: investigations into the phenomenon of ischaemic preconditioning // *Cardiovasc. J. Afr.* — 2009. — Vol. 20, №1. — P. 43–51.
15. **Mallet R.T., Ryou M.-G., Manukhina E.B., Downey H.F.** Beta-Adrenergic Signaling and ROS: Pivotal Roles in Intermittent, Normobaric Hypoxia-Induced Cardioprotection. Intermittent Hypoxia: From Molecular Mechanisms To Clinical Applications // Eds. L. Xi, T.V. Serebrovskaya. — Nova Science Publishers, Hauppauge. — 2009. — P. 189–212.
16. **Marber M.S., Latchman D.S., Walker J.M., Yellon D.M.** Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction // *Circulation*. — 1993. — Vol. 88. — P. 1264–1272.
17. **Manukhina E.B., Downey H.F., Mallet R.T.** Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia // *Exp. Biol. Med.* — 2006. — Vol. 231. — P. 343–365.
18. **Manukhina E.B., Downey H.F., Lyamina S.V., Lyamina N.P.** Beneficial effects of adaptation to hypoxia in patients with ischemic heart disease and extrasystolic arrhythmias // *J. Mol. Cell. Cardiol.* — 2007. — Vol. 42, №6. — Suppl. 1. — S9.
19. **Meerson F.Z.** Essentials of Adaptive Medicine: Protective Effects of Adaptation. — Moscow: Hypoxia Medical LTD, 1994.
20. **Neckar J., Ostadal B., Kolar F.** Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery // *Physiol. Res.* — 2004. — Vol. 53. — P. 621–628.
21. **Neckar J., Papousek F., Novakova O.** et al. Cardio-protective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive // *Basic Res. Cardiol.* — 2002. — Vol. 97. — P. 161–167.
22. **Parish J.M., Somers V.K.** Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease // *Mayo Clin. Proc.* — 2004. — Vol. 79. — P. 1036–1046.
23. **Serebrovskaya T.V., Manukhina E.B., Smith M.L.** et al. Intermittent hypoxia: Cause of or therapy for systemic hypertension? // *Exp. Biol. Med.* — 2008. — Vol. 233, №6. — P. 627–650.
24. **Zhu W.Z., Xie Y, Chen L.** et al. Intermittent high altitude hypoxia inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores against reperfusion injury // *J. Mol. Cell. Cardiol.* — 2006. — Vol. 40, №1. — P. 96–106.
25. **Zong P., Setty S., Sun W.** et al. Intermittent hypoxic training protects canine myocardium from infarction // *Exp. Biol. Med.* (Maywood). — 2004. — Vol. 229, №8. — P. 806–812.

Поступила 20.03.12

### Сведения об авторах:

Смирнова Елена Александровна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаб. патофизиологии кровообращения ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Шимкович Мария Вадимовна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаб. молекулярных механизмов адаптации ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Терехина Ольга Леонидовна, науч. сотр. лаб. патофизиологии кровообращения ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Горячева Анна Владимировна, науч. сотр. лаб. регуляторных механизмов адаптации, ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Чепурнова Дарья Александровна, аспирант лаб. регуляторных механизмов адаптации, ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Дауни Г.Ф., проф. Отдела интегративной физиологии Центра медицинских наук Университета Северного Техаса

Маллет Р.Т., проф. отд. интегративной физиологии Центра медицинских наук Университета Северного Техаса

Манухина Евгения Борисовна, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. регуляторных механизмов адаптации, ФГБУ «НИИОПП» РАМН, адъюнкт-профессор отд. интегративной физиологии Центра медицинских наук Университета Северного Техаса

А.А. Горкун<sup>1</sup>, И.Н. Сабурин<sup>1</sup>, Н.В. Кошелева<sup>1</sup>, И.М. Зурина<sup>1</sup>,  
А.А. Пулин<sup>1</sup>, М.Ю. Шагидулин<sup>2</sup>, Н.А. Онищенко<sup>2</sup>, В.С. Репин<sup>1</sup>

## **Эндотелиальные прогениторные клетки в мезенхимосфероидах пупочного канатика и их участие в процессах ангиогенеза и васкулогенеза при острой печеночной недостаточности**

<sup>1</sup> ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

<sup>2</sup> Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, 123182, Москва, ул. Щукинская, 1

*Наши результаты показывают, что фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) индуцирует образование эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) в сфероидах мультипотентных мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика (ММСК ПК). ЭПК могут принимать участие в регенерации сосудов поврежденного органа. Через 1 мес. после ксеногенной трансплантации сфероидов наблюдали встраивание единичных человеческих Flk-1+ клеток в сосуды реципиента. Планируется дальнейший поиск оптимальных условий воздействия сфероидов на регенерацию печени через ангиогенез.*

**Ключевые слова:** 3D культура, ММСК, ЭПК, васкулогенез, ангиогенез

A.A. Gorkun<sup>1</sup>, I.N. Saburina<sup>1</sup>, N.V. Kosheleva<sup>1</sup>, I.M. Zurina<sup>1</sup>,  
A.A. Pulin<sup>1</sup>, M.Iu. Shagidulin<sup>2</sup>, N.A. Onischenko<sup>2</sup>, V.S. Repin<sup>1</sup>

## **Endothelial progenitor cells in umbilical cord-derived mezenhimosferoids and their participation in the processes of angiogenesis and vasculogenesis in acute liver failure**

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

<sup>2</sup> Institute of Transplantology and Artificial Organs, 1, Schukinskaya str., Moscow, 123182, Russia

*Our results show that vascular endothelial growth factor (VEGF) induces the appearance of endothelial progenitor cells (EPC) in spheroids of human umbilical cord-derived multipotent mesenchymal stromal cells (HUC-MMSC). EPC may taking part in the regeneration of blood vessels damaged organ. 1 month after xenogeneic transplantation spheroids observed in corporation of individual human Flk-1+ cells in the blood vessels of the recipient. We look forward to further experiments to find the optimal treatment conditions spheroids on liver regeneration through angiogenesis.*

**Key words:** 3D culture, MMSC, EPC, vasculogenesis, angiogenesis

В основе многих патологических состояний лежит нарушение структуры кровеносной системы [5]. Сосудистая сеть млекопитающих динамически перестраивается на протяжении всего онтогенеза в соответствии с потребностями окружающих тканей. Основными механизмами образования и роста кровеносных сосудов являются ангиогенез и васкулогенез. Ангиогенез представляет собой развитие новых сосудов из существующих за счет направленной миграции из них эндотелиальных клеток. Тогда как васкулогенез — образование и обновление эндотелия за счет отдель-

ных клеток, мигрировавших из крови и окружающих тканей. Было установлено, что за формирование и рост сосудов отвечают эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК), маркирующиеся экспрессией CD31+/Flk-1+/vWF+. Введение данных клеток в ишемизированные ткани [2, 8], в сердечную мышцу при инфаркте миокарда [6, 7] и в ткань печени при хронической недостаточности [9] приводило к восстановлению кровоснабжения и усилению регенерации. Восстановление кровеносной сети печени сопровождалось снижением фиброза. Однако клиническое применение ауто-ЭПК лимитировано их очень низким количеством в циркулирующей крови: 2—3 ЭПК/л [3]. Поэтому за последнее десятилетие силь-

**Для корреспонденции:** Горкун Анастасия Алексеевна, мл. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: stgork@gmail.com

но возрос интерес к лабораторному получению ЭПК из доступных резервов мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) взрослых тканей. Пупочный канатик (ПК) на сегодняшний день также является источником ММСК [4] и может быть новым источником получения и ЭПК.

Целью нашей работы стало изучение способности ММСК ПК дифференцироваться в ЭПК в 3D культуре и сохранять свои эндотелиальные характеристики при помещении в условия развития патологического процесса.

### Методика

#### 2D культивирование ММСК ПК

Для получения гомогенной популяции ММСК ПК первичную диссоциированную культуру клонировали на чашках Петри в плотности 3—4 кл/см<sup>2</sup>. Дальнейшее культивирование проводили в стандартных условиях (37°C; 5% CO<sub>2</sub>) в полной ростовой среде DMEM/F12 (1:1, ПанЭко) с добавлением глутамина (2 mM L, ПанЭко), гентамицина (50 мкг/мл, ПанЭко), инсулин-трансферрин-селенита (1:100, ПанЭко), bFGF (1:1000, Проспек), гепарина (1,5:1000, Синтез) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone), замену среды осуществляли каждые 3 суток. После четвертого пассажа выращивания в монослойной культуре ММСК ПК переводили в условия 3D культивирования.

#### 3D культивирование ММСК ПК на агарозных планшетах

Для получения 3D сфероидов ММСК ПК применяли 3D культивирование в агарозных планшетах, которое позволяло получать большое количество идентичных сфероидов. Агарозные планшеты получали при полимеризации агарозы (Sigma) в специальных пластмассовых формочках (3D PetriDishes, Microtissue, США). После полимеризации 256-луночные агарозные планшеты помещали на чашки Петри (35 мм) лунками вверх и заливали их суспензией диссоциированных клеток в 190 мкл среды. Концентрацию клеток подбирали в зависимости от диаметра и количества лунок и желаемой плотности формирующихся сфероидов. В нашем случае она составила примерно  $2,7 \times 10^6$  кл/мл. Дальнейшее культивирование проводили в индукционной среде следующего состава: DMEM/F12 (1:1, ПанЭко) с добавлением глутамина (2 mM L, ПанЭко), гентамицина (50 мкг/мл, ПанЭко), ИТС (1:100, ПанЭко) (инсулин, трансферрин, селенит), bFGF (1:1000, Проспек), VEGF (1:10000, Проспек), гепарина (1,5:1000, Синтез) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone).

#### Моделирование ангиогенеза в матригеле

Капли матригеля (BD Bioscience) наносили на дно предварительно охлажденных до -20°C чашек Петри (35 мм) с помощью холодной серологической пипетки и оставляли на 30 мин при 37°C для полимеризации.

Сформировавшиеся сфероиды из ММСК ПК собирали с помощью наконечника до 1000 мкл в центрифужную пробирку (15 мл) и центрифугировали (5 мин, 600 об./мин, 60 g). После удаления супернатанта, сфероиды аккуратно наконечником (1000 мкл) размешивали в 200 мкл ростовой среды и с помощью инсулинового шприца вводили их в матригель. Чашки Петри с матригелем после введения сфероидов заливали индукционной средой и культивировали в течение 9 суток. Визуализацию роста тубулоподобных структур осуществляли с помощью фазово-контрастного микроскопа СКХ41 (Olympus, Япония), фоторегистрацию производили цифровой камерой Invenio3S (Olympus, Япония) в программе DeltaPix (Olympus, Япония).

#### Модель острой печеночной недостаточности

Модель токсического повреждения печени воспроизводилась на крысах породы Wistar по стандартному протоколу. Животным вводили CCl<sub>4</sub> (2 мл/кг веса в 10%-ном растворе растительного масла) внутривенно дважды в неделю в течение 6 недель. Инъекцию клеточного материала проводили через 7 суток после прекращения введения CCl<sub>4</sub>.

#### Инъекция васкуляризованных сфероидов

Непосредственно перед введением модельным животным сформированные сфероиды после культивирования в индукционной среде на агарозных планшетах в течение семи дней в стандартных условиях (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) собирали с помощью наконечника (1000 мкл) в пробирку (15 мл) и центрифугировали (5 мин, 600 об./мин, 60 g). После удаления супернатанта, сфероиды аккуратно размешивали в 200 мкл физиологического раствора и с помощью инсулинового шприца инъецировали в нижнюю долю печени во время операции. Иммуносупрессию не проводили. Анестезию животных осуществляли с помощью золетила (0,5 мл на 100 г веса). Иммуногистохимическое исследование поврежденной печени производили через 1 мес. после инъекции.

#### Фиксация 2D и 3D культур клеток и печени крыс

Для дальнейшего иммуногистохимического анализа сфероиды, предварительно очищенные от культуральной среды, фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение 20 мин. Затем сфероиды помещали в 20%-ный раствор глюкозы на 4 ч и готовили

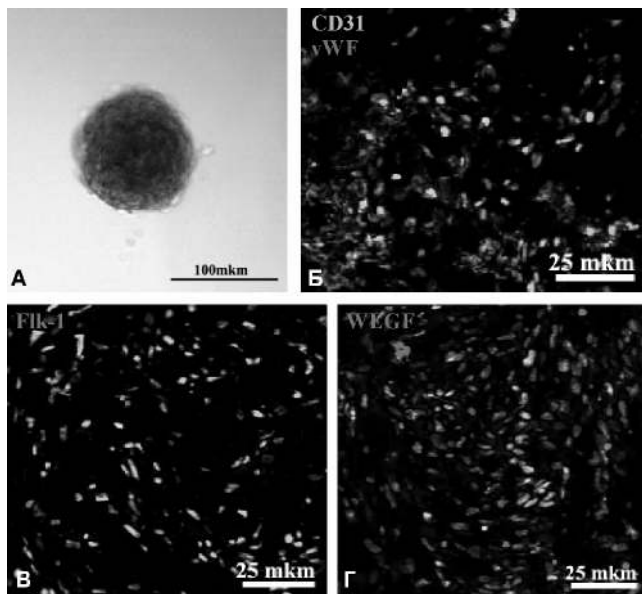


Рис. 1. Экспрессия маркеров ЭПК в 3D культуре ММСК ПК. Световая микроскопия. А — внешний вид сфероидов ММСК ПК; Б — экспрессия CD31 (зеленый) и vWF (красный), стрелками указаны люмены; В — экспрессия Flk-1; Г — экспрессия VEGF. Ядра окрашены Hoechst 33258 (синий). Лазерная конфокальная микроскопия

серию срезов толщиной 10—20 на криотоме SM1850UV (Leica, Германия). После декапитации печень крыс фиксировали в 10%-ном растворе формалина в течение суток. Далее печень помещали на 12 ч в 20%-ный раствор сахарозы. По метке выбирали место локального введения сфероидов и готовили серию срезов сфероидов толщиной 10 мкм на вибротоме VT 1200 S (Leica, Германия).

### Иммуноцитохимия

Срезы сфероидов инкубировали с первичными антителами к CD31, vWF, Flk-1, VEGF (ThermoScientific), а затем с видоспецифичными вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромами

FITC и DyLight594 (ThermoScientific). Полученные препараты накрывали покровным стеклом, и анализировали в видимом и ультрафиолетовом световых диапазонах под микроскопами Axiovert 25 (CarlZeiss, Германия), Axiovert 200M и лазерным конфокальным микроскопом OlympusFluoview FV10I (Olympus, Япония). Срезы поврежденной печени крыс окрашивали антителами к human nuclei, Flk-1 и к альфафетопротину (ThermoScientific) и анализировали под флуоресцентным микроскопом Axiovert 25 (CarlZeiss, Германия). Ядра докрашивали флуоресцентным красителем бис-бензimid — Hoechst 33258 (Fluka).

### Результаты и обсуждение

Сфероидогенез ММСК ПК в индукционной среде приводил к появлению на 7-е сутки культивирования CD31+/vWF+/Flk-1+/VEGF+ клеток в составе сpherоида (рис. 1). Иммуноцитохимический анализ показал, что CD31+ клетки внутри сpherоида формируют структуры, напоминающие просветы сосудов — люмены (рис. 1Б, стрелки). Помещение васкуляризованных сpherоидов в матригель сопровождалось образованием разветвленной сети тубулоподобных структур (рис. 2). Уже на вторые сутки происходила направленная миграция клеток, формирующих новый тяж вслед за ведущей клеткой (рис. 2А). На 5-е сутки культивирования количество тяжей увеличивалось, наблюдалось их ветвление, к 9-м суткам — клетки сpherоида формировали разветвленный плексус (рис. 2В).

При ксеногенной трансплантации индуцированных VEGF мезенхимосpherоидов ПК в поврежденную ткань печени крыс через 1 мес. после инъекции мы наблюдали переживание отдельных клеток и встраивание их в сосуды реципиента даже без иммуносупрессии (рис. 3). Клетки, несущие маркер Flk-1 (маркер эндотелиальных клеток), находились в эндотелиальном слое сосудов печени (рис. 3Б).

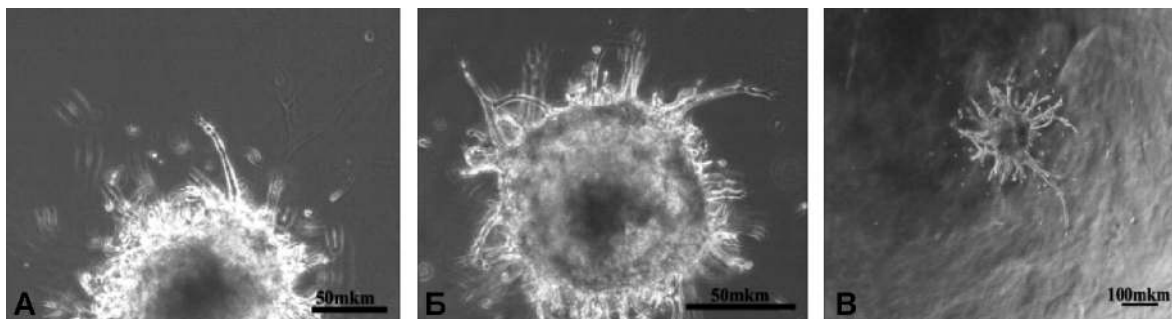


Рис. 2. Образование тубулоподобных структур при культивировании сфероидов ММСК ПК в матригеле: А — на 2-е сутки; Б — на 5-е сутки; В — на 9-е сутки. Световая микроскопия

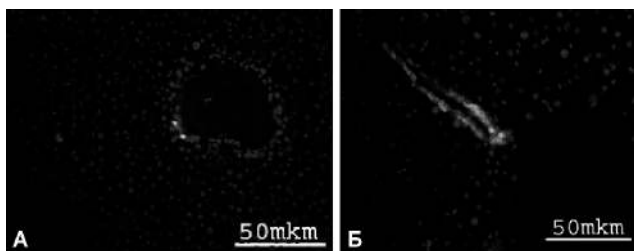


Рис. 3. Исследование выживаемости и сохранения экспрессии маркеров эндотелия клетками 3D культуры печени в условиях развития патологического процесса:

А — интеграция выживших человеческих клеток (зеленый) с тканями печени реципиента; Б — клетки человека (зеленый), встроившиеся в стенку сосуда, экспрессируют Flk-1 наравне с эндотелиоцитами реципиента (красный)

Наши результаты показывают, что VEGF индуцирует образование в сфероиде ММСК ПК ЭПК, способных принимать участие в регенерации сосудов поврежденного органа. Мезенхимосфероиды оказались пока единственной моделью образования люменов в тканеподобной структуре. Сегодня это наиболее естественный прототип новообразования и регенерации сосудистой сети *in vivo*. Встраивание клеток и сохранение экспрессии специфического маркера свидетельствует о регенераторном значении этого феномена. Наблюдаемый нами ангиогенез может способствовать обратному развитию фиброза органа [9]. «Не только экспериментальные, но и ряд клинических наблюдений свидетельствуют о том, что при определенных условиях избыточно разросшаяся, фиброзная ткань может исчезнуть» [1]. Разработанный метод получения васкуляризованных мезенхимосфероидов имеет существенное значение для патологической физиологии, а

также может найти применение в тканевой инженерии и регенерационной медицине.

### Список литературы

1. *Саркисов Д.С.* Очерки по структурным основам гомеостаза. — М.: Медицина, 1977. — 35 с.
2. *Asahara T.* Endothelial progenitor cells for vascular medicine // *Yakugaku Zasshi.* — 2007. — Vol. 127, №5. — P. 841—845.
3. *Asahara T., Murohara T., Sullivan A.* et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis // *Science.* — 1997. — №275. — P. 964—967.
4. *Baksh D., Yao R., Tuan R.S.* Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow // *Stem Cells.* — 2007. — Vol. 25, №6. — P. 1384—1392.
5. *Chappell J.C., Bautch V.L.* Vascular development: genetic mechanisms and links to vascular disease // *Curr. Top. Dev. Biol.* — 2010. — Vol. 90. — P. 43—72.
6. *Chong J.J.* Cell therapy for left ventricular dysfunction: an overview for cardiac clinicians // *Heart Lung Circ.* — 2012. — Vol. 21, №9. — P. 532—542.
7. *Jujo K., Ji M., Losordo D.W.* Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium // *J. Mol. Cell. Cardiol.* — 2008. — Vol. 45, №4. — P. 530—544.
8. *Kim S.W., Kim H., Cho H.J.* et al. Human peripheral blood-derived CD31+ cells have robust angiogenic and vasculogenic properties and are effective for treating ischemic vascular disease // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2010. — Vol. 56, №7. — P. 593—607.
9. *Ueno T., Nakamura T., Torimura T., Sata M.* Angiogenic cell therapy for hepatic fibrosis // *Med. Mol. Morphol.* — 2006. — Vol. 39, №1. — P. 16—21.

Поступила 24.10.12

### Сведения об авторах:

*Сабурина Ирина Николаевна*, д-р биол. наук, зав. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБУ «НИИОПП» РАМН

*Кошелева Настасья Владимировна*, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБУ «НИИОПП» РАМН

*Зурина Ирина Михайловна*, мл. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБУ «НИИОПП» РАМН

*Пулин Андрей Алексеевич*, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития, ФГБУ «НИИОПП» РАМН

*Шагидулин Мурат Юнусович*, канд. мед. наук, зав. лаб. по клиническим исследованиям медицинских изделий и технологий ФГБУ «ФНЦТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России

*Онищенко Нина Андреевна*, д-р мед. наук, проф., зав. лаб. биотехнологии стволовых клеток, акад. Академии медико-технических наук РФ ФГБУ «ФНЦТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России

*Репин Вадим Сергеевич*, д-р мед. наук, проф. чл.-кор. РАМН, гл. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБУ «НИИОПП» РАМН

И.А. Собенин<sup>1,2</sup>, Н.С. Жуковский<sup>1</sup>, В.П. Карагодин<sup>5</sup>, Л.И. Ковалев<sup>3</sup>,  
В.А. Мясоедова<sup>2,4</sup>, К. Банфи<sup>4</sup>, С.С. Шишкин<sup>3</sup>, А.Н. Орехов<sup>1,2</sup>

## Изменения протеомного профиля интимы и медиа аорты человека при атеросклерозе

<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, 143025, Москва, Инновационный Центр Сколково, ул. Новая, 100

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, 119071, Москва, Ленинский пр-т, 33, стр. 2

<sup>4</sup> Кардиологический центр Монзино, Milan, Italy, 20138, via Parea, 4

<sup>5</sup> Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова», Москва, Россия, 117997, Стремянный пер., 36

*Изучалась связь между степенью атеросклеротического поражения и протеомным профилем интимы и медиа аорты человека. Представлены результаты двумерного электрофореза ЭФ белков из интимы и медиа, позволяющие изучить протеомные профили различных видов атеросклеротических поражений (жировая инфильтрация, жировая полоса, липофиброзная бляшка, фиброзная бляшка) в сравнении с непораженными атеросклерозом участками. В результате исследования обнаружены белковые пятна, проявляющие различия при сравнении протеомных профилей, подлежащих под непораженными участками интимы и медиа и под липофиброзными бляшками. Предпринята попытка идентификации этих белков с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии.*

**Ключевые слова:** атеросклероз, протеомика, аорта, белковый профиль

I.A. Sobenin<sup>1,2</sup>, N.S. Zhukovsky<sup>1</sup>, V.P. Karagodin<sup>5</sup>, L.I. Kovaljev<sup>3</sup>,  
V.A. Myasoedova<sup>2,4</sup>, K. Banfy<sup>4</sup>, S.S. Shishkin<sup>3</sup>, A.N. Orekhov<sup>1,2</sup>

## Protein profiles changes of human aorta intima and media in atherosclerosis process

<sup>1</sup> Institute for General Pathology and Pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

<sup>2</sup> Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Centre, 100, Novaya str., Moscow, 143025, Russia

<sup>3</sup> Bach Institute of Biochemistry RAS, 33, Leninsky prospekt, Moscow, 119071, Russia

<sup>4</sup> Research Center for Cardiology, 4, via Parea, Milan, 20138, Italy

<sup>5</sup> Plekhanov Russian University of Economics, 36, Stremyanny per., Moscow, 117997, Russia

*The present study was undertaken in order to examine association between various stages of atherosclerotic lesion and protein maps of human aorta intima and media. The results of the two dimensional electrophoresis of intima and media demonstrate protein profiles of various stages of atherosclerotic lesion (initial stages, lipid strips, lipofibrous plaques, fibrous plaques) versus controls (unaffected aorta sites). Protein spots that have been differentially expressed were found under unaffected intima and media sites versus lipofibrous plaques. Some of these proteins were identified using matrix assisted desorption ionisation time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry.*

**Key words:** atherosclerosis, proteomics, aorta, protein profile

Атеросклероз является одной из наиболее важных медико-социальных проблем, занимая ведущее место в структуре заболеваемости и смертности. Тщательный анализ белков из пораженной атеросклерозом ткани артерий мог бы обнаружить виды белков, которые участвуют в сосудистом ремоделировании и атерогенезе. Идентификация атеросклеротического протеома че-

ловека — фундамент для дальнейших исследований, основа для построения и проверки новых гипотез. Очевидно, что выявление функциональной связи между атеросклеротическими поражениями и протеомическим профилем интимы аорты человека имеет исключительное значение для понимания иницирующих причин возникновения атеросклероза. Уже созданы базы данных по сотням белков протеома миокарда, уровни которых изменяются при сердечно-сосудистой патологии, как острой, так и хронической [2]. Однако

до настоящего времени лишь в очень небольшом количестве работ были исследованы белки, выделенные из атеросклеротических бляшек аорты человека [4, 5, 7]. *Цель исследования* — изучение протеомных профилей интимы и меди артерий при разных стадиях атеросклеротического поражения.

### Методика

Материалом для исследования служили аутопсийные образцы грудного отдела аорт мужчин и женщин в возрасте 40—65 лет, получаемые в течение 1,5—3 ч после внезапной смерти. Причиной смерти в подавляющем большинстве случаев была острая сердечно-сосудистая недостаточность. Обработку аутопсийного материала проводили в стерильных условиях. После механического удаления адвентиции аорту пересекали вдоль и промывали в холодном фосфатном буфере для удаления любых следов крови. Из лоскута аорты вырезали участки, не пораженные атеросклерозом, а также участки, соответствующие различным стадиям атеросклеротических поражений (жировая инфильтрация, жировая полоса, липофиброзная бляшка, фиброзная бляшка) в соответствии с классификацией Stary [13, 14]. Затем с помощью пинцетов интиму отделяли от меди, при этом разделение слоев происходило по внутренней пограничной эластической мембране. Выделенные образцы размером 1x1 см вновь тщательно промывали в холодном фосфатном буфере, немедленно замораживали в жидком азоте и растирали фарфоровым пестиком в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния. После упаривания жидкого азота при комнатной температуре образцы лиофилизировали в лиофильной сушке в течение 6 ч. Хранение образцов вплоть до выделения белков проводили при  $-80^{\circ}\text{C}$  в низкотемпературном морозильнике.

Для выделения белков из порошкообразных образцов использовали два метода. В первом — порошок растворяли в мочевином буфере  $\text{pH}=8.0$  (мочевина 8 М, тиомочевина 2 М, CHAPS 4%, дитиотреитол 1%, Трис 20 мМ) из расчета 7 мл буфера на 1 г порошка. Буфер готовили заранее, фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и хранили до использования в аликвотах при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Непосредственно перед добавлением буфера к образцу к нему добавляли коктейль из ингибиторов протеаз (из расчета 1 мкл/мл раствора ортованадата натрия 1 М, 1 мкл/мл раствора аprotинина 10 мг/мл, 2 мкл/мл раствора фенолметилсульфонилфлюорида 0,5 М, 2 мкл/мл раствора леупептина 1 мг/мл, 2 мкл/мл раствора бензамидина 100 мМ). Экстракцию белков проводили в течение 1 ч при непрерывном перемешивании на шейкере при комнатной температуре. По окончании экстракции образцы центрифугировали

при 15 000 g при комнатной температуре в течение 30 мин, отбирали супернатант и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до проведения 2D электрофореза.

Во втором методе порошок растворяли в ледяном Rira-буфере  $\text{pH}=8.0$  (Трис 50 мМ, натрия хлорид 150 мМ, Тритон X-100 1%, дезоксихолат натрия 1%, додецилсульфат натрия 0,1%). Непосредственно перед добавлением буфера к образцу к нему добавляли вышеописанный коктейль из ингибиторов протеаз. Гомогенизацию образцов в буфере выполняли на гомогенизаторе тканей Tissue Tearor (Biospec Products, США) при 10 000 об./мин 3 раза по 10 с с последующей мягкой сонификацией при 30% максимальной мощности 3 раза по 10 с; операции выполняли на льду. По окончании гомогенизации образцы центрифугировали при 15 000 g при комнатной температуре  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин, отбирали супернатант и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до проведения 2D электрофореза. Концентрацию белка в экстрактах определяли по Lowry.

Для проведения 2D электрофореза 250 мкг экстрагированного белка обессоливали путем фильтрации на колонках Spin-X (Costar). Далее, исследуемый образец очищали и осаждали с использованием набора 2D-Clean-up (GE Healthcare) в соответствии с инструкцией производителя. После обессоливания образцы ресуспендировали в регидратирующем буфере. Для электрофореза в первом измерении к образцам добавляли трибутилфосфин в качестве восстановителя и амфолиты (Bio-Rad), электрофорез проводили в полиакриламидных стрипах с фиксированными градиентами  $\text{pH}$  4—7 и 3—10 (Bio-Rad). Изоэлектрофокусировку проводили в горизонтальном направлении при  $20^{\circ}\text{C}$ , как описано Lazago с соавторами [6]. Во время изоэлектрофокусировки 2 полоски фильтровальной бумаги и полиакриламидные стрипы были помещены между электродами (Electrode Wicks, Bio-Rad) для удаления солей, избытка воды и белков с изоэлектрической точкой, находящейся вне пограничных значений  $\text{pH}$  для используемых полиакриламидных стрипов.

По окончании изоэлектрофокусировки стрипы выдерживали в эквilibрирующем буфере и проводили электрофорез во втором измерении. Затем гели окрашивали серебром с использованием наборов Ampholine PAGplate (Pharmacia Biotech, GE Healthcare) в соответствии с инструкцией производителя. Окрашенные гели сканировали на GS-800 сканере-денситометре (Bio-Rad) и анализировали с помощью программного пакета PDQUEST 8.0 (Bio-Rad).

Для идентификации белков соответствующие пятна вырезали из геля, переваривали на автомате Ettan Digester (GE Healthcare) и проводили определение методом MALDI-TOF/TOF и поиском соответст-

вий в базе данных. Вкратце, фрагменты геля восстанавливали 10 мМ дитиотреитолом (Sigma Aldrich) в 50 мМ бикарбонате аммония (Scharlau) и алкилировали 55 мМ иодоацетамидом (Sigma Aldrich) в 50 мМ бикарбонате аммония. Фрагменты геля отмывали в 50 мМ бикарбонате аммония, 50% метаноле (Scharlau) и ацетонитриле (Scharlau), и высушивали в Speedvac (Thermo Fisher). Модифицированный свиной трипсин (Promega, США) добавляли к фрагментам геля в конечной концентрации 20 нг/мкл в 20 мМ бикарбонате аммония и переваривали в течение ночи при 37°C. Наконец, добавляли 60% водный раствор ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой (Sigma Aldrich) для полной экстракции пептидов.

По окончании переваривания аликвоты образцов смешивали с аликвотами матрикса  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты (Sigma Aldrich) в 50% ацетонитриле с 0,1% трифторуксусной кислотой. Смесь помещали тонким слоем на 123×81 мм Opti-TOF 384 Well MALDI plate (Applied Biosystems) и высушивали при комнатной температуре. Данные MALDI-MS/MS получали автоматически при масс-спектрометрии на анализаторе 4800 Plus MALDI/TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems).

Спектры поглощения захватывали в режиме положительно заряженных ионов, используя 355-нм Nd:YAG лазер с частотой 200 Гц, и получали от 100 до 2000 индивидуальных спектров. Для анализа фрагментов ионов в тандеме TOF/TOF, ионы-предшественники ускорялись до 8 кВ и отбирались в порту входа ионов. Фрагменты, возникающие в результате столкновения между предшественниками и воздухом в коллизионной камере, были ускорены до 15 кВ в источнике 2, и их массы были проанализированы после прохождения отражателя ионов. Данные о массах были проанализированы автоматически с помощью программного пакета 4000 Series Explorer версии 3.5.3 (Applied Biosystems). Внутренняя калибровка MALDI-TOF проводилась с использованием 2 ионов автолиза трипсина ( $m/z=842,510$  и  $m/z=2211,105$  соответственно). Калибровка MALDI-MS/MS проводилась с использованием ионных спектров фрагментов Glu1-фибринопептида В (4800 MALDI/TOF-TOF, Applied Biosystems). Данные MALDI-MS и MS/MS были объединены с помощью программы GPS Explorer версии 3.6, которая позволяет проводить нерезервирующий поиск в базе данных белков NCBIнг белка (версия 20080225) с использованием программы Mascot версии 2.1 (Matrix science), при допуске ошибки определения массовой доли до 50 ppm и одного пропуска расщепления.

## Результаты и обсуждение

В результате исследования обнаружены белковые пятна, проявляющие различия при сравнении протеомных профилей, подлежащих под непораженными участками интимы и меди и под липофиброзными бляшками.

На рис. 1 представлены 2D-электрофореграммы экстрактов белка из образцов ткани непораженной интимы аорты человека и липофиброзной бляшки, полученных из одного аутопсийного материала. Очевидно, что полученные протеомные профили имеют существенные качественные и количественные различия. В частности, в липофиброзной бляшке (наиболее активной и угрожающей жизни форме атеросклеротического поражения) по сравнению с нормой отмечается преобладание белков с массой 75—90 кДа и изоэлектрической точкой в интервале рН от 5 до 7; белков с массой около 65 кДа и изоэлектрической точкой в интервале рН от 4,5 до 5,5. При этом в липофиброзной бляшке уменьшено содержание белков с массой около 70 кДа и около 40 кДа и изоэлектрической точкой в интервале рН от 4,5 до 5,0. Также существуют многочисленные менее выраженные различия.

На рис. 2 представлены электрофореграммы экстрактов белка из образцов ткани интимы, полученной из аутопсийного материала, в котором присутствовали, наряду с непораженными участками, все изучаемые виды атеросклеротических поражений (начальные поражения, жировая полоса, липофиброзная бляшка, фиброзная бляшка). Очевидно, что существенные изменения в протеомном профиле происходят уже на самых ранних стадиях формирования атеросклеротического поражения, т.е. при жировой инфильтрации. Макроскопически начальные поражения представляют собой участки с гладкой желтоватой поверхностью, иногда с мелкими желтыми точками; микроскопические изменения при этом минимальны: наблюдаются небольшие накопления внеклеточных липидных капель в соединительно-тканном матриксе. Считают, что в участках начальных поражений, по-

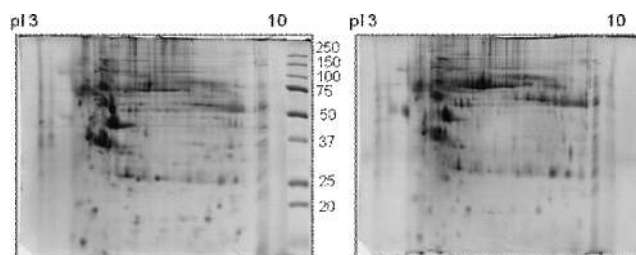


Рис. 1. 2D электрофорез экстрактов белков из интимы аорты человека. Слева — непораженная интима аорты, справа — липофиброзная бляшка. Окраска серебром.



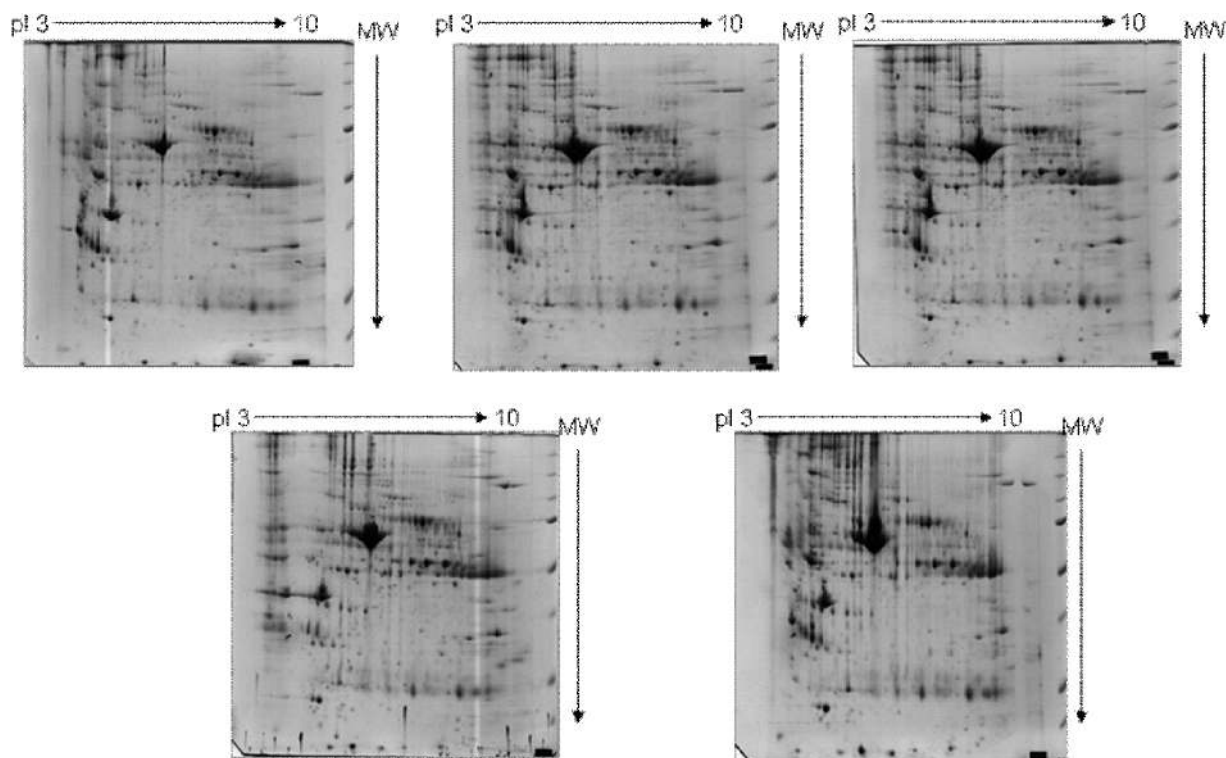


Рис. 2. 2D электрофорез экстрактов белков из интимы аорты человека. Вверху слева — непораженная интима аорты, вверху посередине — жировая инфильтрация (начальные поражения), вверху справа — жировая полоса, внизу слева — липофиброзная бляшка, внизу справа — фиброзная бляшка. Окраска серебром.

мимо оседлых клеток, отмечается несколько увеличенное по сравнению с непораженной интимой количество мононуклеарных клеток; при этом отсутствуют явные нарушения в структуре ткани. В этот момент, как показано нами, протеомный профиль ткани уже существенно изменен. Несмотря на существенные морфологические изменения, происходящие при прогрессировании атеросклероза (формирование жировых полос, липофиброзных и фиброзных бляшек — накопление внутриклеточных и внеклеточных липидов, разрастание соединительнотканного матрикса, изменение клеточного состава ткани, формирование возвышающихся поражений), принципиальных изменений протеомного профиля по сравнению с начальными поражениями уже не происходит.

Считается, что при атеросклерозе основные патологические изменения происходят в интима артерий как морфологическом субстрате для формирования атеросклеротических поражений, а в медиальном слое наблюдаются вторичные изменения. Для оценки таких изменений было проведено изучение протеомного профиля участков меди, подлежащих под неизменной интимой и под липофиброзной бляшкой (рис. 3). Очевидно, что в меди также происходят существенные изменения протеомного профиля, ассоциированные с наличием атеросклеротического поражения. Ключевые различия бел-

ковых пятен, выявленные на данных электрофореграммах, приведены на рис. 4 (фрагменты фото). На рис. 5 представлено фото электрофореграммы экстракта белков из меди, подлежащей под непораженным участком интимы аорты человека. Стрелками указаны белковые пятна в области белков массой менее 33 кДа, для которых наблюдаются наиболее выраженные количественные изменения при анализе участков меди, подлежащих под атеросклеротическими поражениями (липофиброзными и фиброзными бляшками).

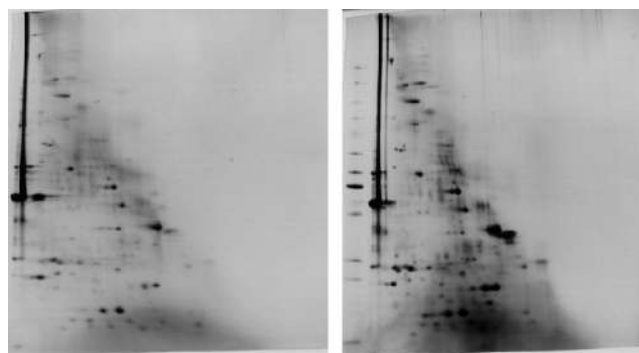


Рис. 3. 2D электрофорез экстрактов белков из участка меди аорты человека, подлежащего под непораженным участком интимы (слева) и под липофиброзной бляшкой (справа). Окраска серебром.

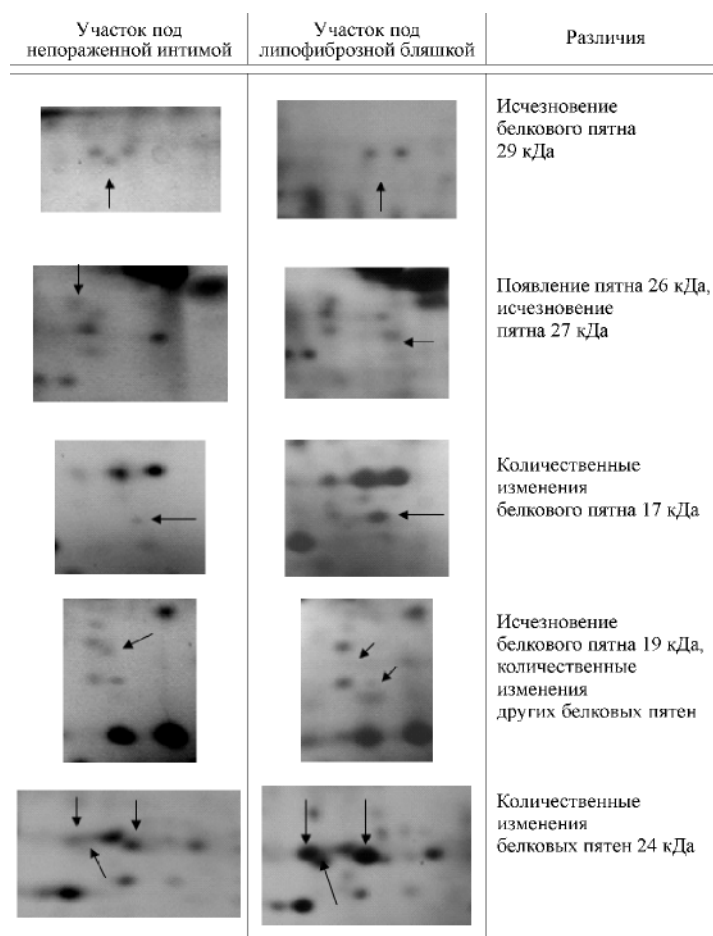


Рис. 4. Фрагменты двумерных электрофореграмм белков меди аорты человека

Была предпринята попытка идентификации данных белков с использованием технологии MALDI-TOF масс-спектрометрии. Результаты анализа представлены в таблице. Эти низкомолекулярные белки оказались фрагментами изоформы 1 аннексина-2,  $\alpha$ -В-кристаллина,  $\gamma$ -гас онкогена, белка теплового шока  $\beta$ -1, бетаглобина, трансгелина и его изоформ, а также пероксиредоксина-1. Следует отметить, что данный анализ носил весьма ограниченный характер. Из-за сложности процедуры идентификации на данном этапе исследования не были включены белки с молекулярной массой более 40 кДа, хотя из результатов 2D электрофореза, представленных на рис. 1—3, очевидно, что в этом диапазоне молекулярных масс при развитии атеросклеротических поражений также происходят существенные изменения протеомного профиля как в интимальном, так и медиальном слое аорты.

Исследование протеома элементов сердечно-сосудистой системы, атеросклеротические изменения в которой затрагивают многие ее компоненты, включая гладкомышечные и эндотелиальные клетки, привлека-

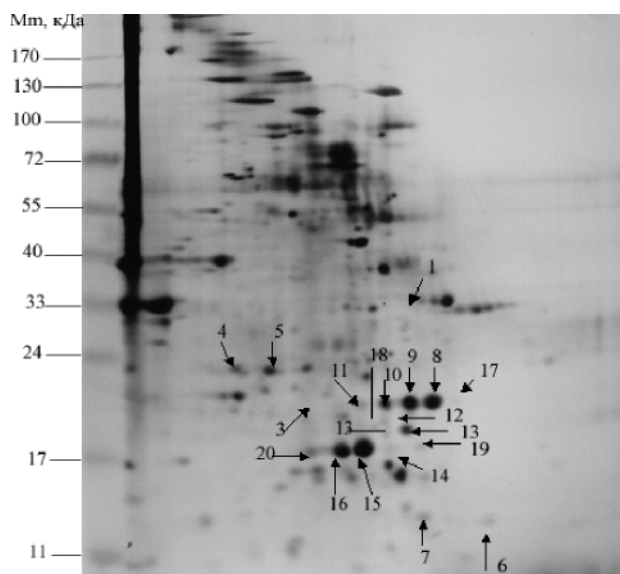


Рис. 5. 2D электрофорез экстракта белков из участка меди аорты человека, подлежащего под неповрежденным участком интимы. Стрелками указаны пятна, идентифицированные с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. Окраска серебром.

Результаты идентификации пятен белков из 2D электрофореграмм белков меди аорты человека

№	Белок	Номер в NCBI protein	Вероятностный коэффициент достоверности / количество выявленных масс пептидов	% перекрытия	Mw/pI эксп.	Mw/pI теор.
1	Аннексин-2, изоформа 1 (фрагмент)	50845388	74/11	35	35,0/7,25	40,4/8,53
2	Альфа-В-кристаллин	4503057	62/5	23	19,5/7,30	20,1/6,76
3	г-гас онкоген	5454028	117/8	45	22,5/6,50	23,5/6,44
4	Белок теплового шока бета-1	4504517	97/10	52	23,0/5,60	22,8/5,98
5	Белок теплового шока бета-1	4504517	97/10	25	23,0/5,80	22,8/5,98
6	Цепь А гемоглобина	61679690	68/8	64	15,5/8,30	15,1/8,72
7	Бета глобин	71727231	117/7	60	16,0/7,80	16,0/7,86
8	Трансгелин	48255905	89/10	50		22,6/8,87
9	Трансгелин	48255905	206/22	83		22,6/8,87
10	Трансгелин	48255905	145/10	53		22,6/8,87
11	Смесь трансгелина и пероксиредоксина-1	48255905, 55959887	122/10, 53/5	52, 27		22,6/8,87
12	Трансгелин	48255905	147/12	47		22,6/8,87
13	Трансгелин	48255905	106/8	37		22,6/8,87
14	Трансгелин	48255905	142/10	45		22,6/8,87
15	Трансгелин	48255905	172/21	73		22,6/8,87
16	Трансгелин	48255905	143/17	64		22,6/8,87
17	Трансгелин, изоформа CRA_c	119587704	55/6	33		23,7/8,54
18	Альфа-В-кристаллин	4503057	62/5	26		20,1/6,76
19	Трансгелин вариант	62897565	67/6	23		20,9/8,69
20	Трансгелин вариант	62897565	54/5	28		20,9/8,69

Примечание. Приведены результаты компьютерного поиска по базам данных о секвенированных последовательностях (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) — процент совпадения выявленных масс триптических пептидов с аминокислотной последовательностью соответствующего белка.

ет внимание ряда ученых. Представляется, что выявление модифицируемых патологией белков может дать ключ как к пониманию механизмов атеросклероза, так и к его лечению. В данный момент таких экспериментов, характеризующихся как «функциональная протеомика», выполнено явно недостаточно. Тем не менее, соответствующее поведение белков, включая изменение их количества, изучалось при кардиомиопатиях человека и животных и в ряде других случаев. Согласно предварительным данным, наиболее обещающими маркерами для кардиопротеомики могут быть тропонины, изоформы  $\alpha$ -1-фибриногена, изоформы аполипопротеина А-1, С-реактивный белок и др. [5].

Главное препятствие для анализа протеома сосудов при атерогенезе — гетерогенность клеточного состава атеросклеротических бляшек [11]. Другой методической проблемой является выбор адекватного контроля, с учетом локализации образца в сосудистой стенке и отсутствия протеолитических изменений до начала анализа. С учетом воспалительной природы атеросклероза, следует принимать во внимание также взаимодействие между инфильтрованными Т-лимфоцитами и макрофагами, образованными из моноцитов. Макрофаги довольно много-

численны и могут маскировать белки, происходящие из компонентов нормальной стенки сосудов.

Несмотря на эти ограничения, первые попытки анализа атеросклеротического поражения с помощью 2-DE были предприняты почти 20 лет назад. Так, Stastny и Fosslie [15] сравнивали белковый состав липофиброзной бляшки с составом нормальной интимы и обнаружили, что белки плазменного происхождения (альбумин, фибриноген, иммуноглобулин G,  $\alpha$ -1 анти-трипсин, трансферрин, гаптоглобин, apo A-I, and apo A-II) аккумулируются в пораженных сосудах. Аналогично, Song et al. [12] обнаружили, что белки из плазмы становятся более многочисленными в интима артерий при старении одновременно с утолщением интимы. Установлено, что остеоонектин усиленно экспрессируется клетками, присутствующими в стенке сосуда при прогрессировании атеросклероза, а именно при кальцификации атеросклеротической бляшки [3].

В более поздних работах с помощью лазерной денситометрии было подтверждено значительное увеличение отношения альбумин/актин в жировых слоях по сравнению с нормой [16]. При сравнении атеросклеротических бляшек коронарных артерий с нор-

мальными коронарными артериями было продемонстрировано увеличение экспрессии ферритина (белка, участвующего в клеточном накоплении железа) в коронарных артериях индивидов с заболеваниями коронарных артерий [18]. В гомогенатах атеросклеротических бляшек человека обнаружено 2-кратное увеличение легкоцепочечного ферритина по сравнению с контролем. Предполагается участие этого белка в образовании активных форм кислорода, вызывающих окисление липидов в стенке коронарных артерий.

В нестабильных бляшках (последние стадии развития) обнаружены также изоформы  $\alpha 1$ -антитрипсина [7] и набора из 27 белков, участвующих в биологических процессах (миграции гладкомышечных клеток, активации металлопротеиназ матрикса, регуляции провоспалительных цитокинов).

В отличие от выяснения роли отдельных белков в развитии атеросклероза, протеомика позволяет оценить микроокружение бляшки в целом. Так, обнаружено снижение уровня белка теплового шока (hsp27) в супернатанте культуры пораженных атеросклерозом клеток, а также hsp27, hsp20, супероксиддисмутаза 3 в стабильных бляшках по сравнению с нестабильными [9].

Наконец, следует указать на работу, в которой изучались белки из иммуногистохимически классифицированных стабильных и нестабильных бляшек сонных артерий [8]. Авторы обнаружили, что около 70% идентифицированных белков происходят из плазмы, что свидетельствует о нарушении барьерных функций эндотелия независимо от типа бляшки. В нестабильных бляшках, по сравнению со стабильными, снижалось содержание супероксиддисмутаза 3 (СОД 3) и глутатион s-трансферазы (ГСТ), белков теплового шока 20 и 27, аннексина А10, а возрастало содержание легкого ферритина, СОД2 и фрагмента D фибриногена. Как известно, все эти белки так или иначе вовлечены в окислительные или воспалительные процессы, а также образование бляшек.

Альтернативный подход к исследованию протеома бляшки применил Dugan et al. [4]. В этих опытах образцы из сонных артерий культивировали в безбелковой среде и анализировали супернатант с помощью 2-DE. Установлено, что белки, высвобождаемые из бляшек, вовлечены в обратный транспорт холестерина (аполипопротеин В-100, аполипопротеин А-1), апоптоз (лектин, растворимый b-галактозидазой), деградацию белков (гидролаза 23) и антиокислительное действие (супероксиддисмутаза, пероксиредоксин 2). С повышением сложности поражения возрастало и количество белков. Однако неясно, выделяются ли эти белки из бляшек активно или пассивная диффузия в среду клеточной культуры происходит легче из бляшек, чем из нормальных артерий. Белок теплового шока 27, секретируемый из бляшки в культуральную сре-

ду, рассматривается как потенциальный маркер атеросклероза, поскольку его содержание снижается как по сравнению с контролем *in vitro*, так и в плазме крови *in vivo*. Другим маркером в работах этой же группы исследователей признается катепсин D.

Принципиально новую методику по исследованию протеомного профиля бляшки предложила группа, руководимая Han [1], разработавшая так называемую процедуру прямой тканевой протеомики (ДТР), позволяющую идентифицировать белки в минимальных количествах ткани сосуда. С этой целью белки экстрагируются из фиксированных формальдегидом и погруженных в парафин образцов ткани, что обеспечивает их более эффективное разделение. Полученный профиль бляшки из коронарной артерии включал в себя 806 белков, ряд из которых и ранее связывали с развитием атеросклероза.

Однако наряду с ними были обнаружены выполняющие регуляторные функции PEDF (pigment-epithelium derived factor), периостин, MFG-E8 (milk fat globule-EGF-factor 8) и аннексин I, а также некоторые факторы роста и цитокины. Авторы полагают, что ими в основном идентифицированы белки внеклеточного матрикса, вовлеченные в развитие атеросклероза и способные мигрировать из меди и интими.

Как и в нашей работе, внимание исследователей привлекают гладкомышечные клетки (ГМК) сосудов, чья пролиферация и миграция важны для развития патологии. Дифференциальная протеомика выявила важную роль шаперонов, а также белков цитоскелета (виментина и актина) в формировании бляшки, продолжается изучение влияния на ГМК окисленных ЛПНП, окислительного стресса, механического гемодинамического напряжения [10]. В частности, в последнем случае обнаружено изменение уровней гелсолина, белка теплового шока hsp27 и CapZ. Здесь уместно отметить, что другие авторы обнаружили увеличение экспрессии hsp60 и hsp70 при атеросклеротическом поражении [17].

С учетом представленных здесь результатов исследований, сходных с выполненными нами, следует указать, как минимум, на подтверждение роли в формировании атеросклеротической бляшки таких низкомолекулярных белков, как аннексины и белки теплового шока. Тем не менее, совершенно ясно, что для уточнения роли белков в атерогенезе с помощью протеомики необходимы дальнейшие исследования на вырезаемых лазером микроучастках сосудов, а также оценка посттрансляционных модификаций белков, в частности, окислительного характера, что может быть полезным как для обнаружения новых маркеров патологии, так и для целей терапии.

*Данная работа была выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации.*

## Список литературы

1. **Bagnato C., Thumar J., Mayya V.** et al. Proteomic analysis of human coronary atherosclerotic plaque: a feasibility study of direct tissue proteomics by liquid-chromatography and tandem mass spectrometry // *Mol. Cell. Proteomics*. — 2007. — Vol. 6, тф26. — P. 1088—1102.
2. **Berhane B.T., Zong C., Liem D.A.** et al. Cardiovascular-related proteins identified in human plasma by the HUPO plasma proteome project pilot phase // *Proteomics*. — 2005. — Vol. 5. — P. 3520—3530.
3. **Donners M.M., Verluyten M.J., Bouwman F.G.** et al. Proteomic analysis of differential protein expression in human atherosclerotic plaque progression // *J. Pathol.* — 2005. — Vol. 206, №2. — P. 39—45.
4. **Duran M.C., Mas S., Martin-Ventura J.L.** et al. Proteomic analysis of human vessels: application to atherosclerotic plaques // *Proteomics*. — 2003. — Vol. 3, №6. — P. 973—978.
5. **Fach M.E., Garulacan L.A., Gao J.** et al. In vitro biomarker discovery for atherosclerosis by proteomics // *Mol. Cell. Proteomics*. — 2004. — Vol. 3. — P. 1200—1210.
6. **Lazaro A., Gallego-Delgado J., Osende J.I.** et al. Expresion diferencial de proteomas en el corazon de ratas espontaneamente hipertensas con hipertrofia cardiaca // *Clin. Invest. Arterioscl.* — 2005. — Vol. 17. — P. 1—9.
7. **Lepedda A.J., Cigliano A., Cherchi G.M.** et al. A proteomic approach to differentiate histologically classified stable and unstable plaques from human carotid arteries // *Atherosclerosis*. — 2009. — Vol. 203, №1. — P. 112—118.
8. **Lutgens E., van Suylen R.J., Faber B.C.** et al. Atherosclerotic plaque rupture: local or systemic process? // *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* — 2003. — Vol. 23, №212. — P. 2123—2130.
9. **Martin-Ventura J.L., Duran M.C., Blanco-Colio L.M.** et al. Identification by a differential proteomic approach of heat shock protein 27 as a potential marker of atherosclerosis // *Circulation*. — 2004. — Vol. 110, Jte 15. — P. 2216—2219.
10. **McGregor E., Kempster L., Wait R.** et al. F-actin capping (CapZ) and other contractile saphenous vein smooth muscle proteins are altered by hemodynamic stress: a proteomic approach // *Mol. Cell. Proteomics* — 2004. — Vol. 3, Jfe2. — P. 115—124.
11. **Rezaee F., Casetta B., Levels J.H.** et al. Proteomic analysis of high-density lipoprotein // *Proteomics* — 2006. — Vol. 6, Jfe 2. — P. 721—730.
12. **Song J., Stastny J., Fosslien E., Robertson A.L. Jr.** Plasma-derived proteins in the aging arterial intima and intimal thickening // *Exp. Mol. Pathol.* — 1985. — Vol. 43. — P. 297—304.
13. **Stary H.C.** Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions: An Update // *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* — 2000. — Vol. 20, №5. — P. 1177—1178.
14. **Stary H.C., Chandler A.B., Glagov S.** et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association // *Circulation*. — 1994. — Vol. 89. — P. 2462—2478.
15. **Stastny J.J., Fosslien E.** Quantitative alteration of some aortic intima proteins in fatty streaks and fibro-fatty lesions // *Exp. Mol. Pathol.* — 1992. — Vol. 57, №3. — P. 205—214.
16. **Sung H.J., Ryang Y.S., Jang S.W.** et al. Proteomic analysis of differential protein expression in atherosclerosis // *Biomarkers*. — 2006. — Vol. 11, №3. — P. 279—290.
17. **Vivanco F., Darde V.M., De la Cuesta F., Bardeiras M.G.** Proteomic Biomarkers of Atherosclerosis // *Cardiovascular Proteomics. Curr. Proteom.* — 2006. — Vol. 3. — P. 147—170.
18. **You S.A., Archacki S.R., Angheloiu G.** et al. Proteomic approach to coronary atherosclerosis shows ferritin light chain as a significant marker: evidence consistent with iron hypothesis in atherosclerosis // *Physiol. Genomics*. — 2003. — Vol. 13, №1. — P. 25—30.

Поступила 27.04.12

## Сведения об авторах:

Карагодин Василий Петрович, канд. биол. наук, старш. науч. сотр. ФГБОУ ВПО РЭУ им. Г.В. Плеханова  
 Жуковский Николай Сергеевич, аспирант ФГБУ «НИИОПП» РАМН  
 Ковалев Леонид Иванович, д-р мед. наук, вед. научн. сотр. ФГБУН ИНБИ РАН  
 Мясоедова Вероника Александровна, канд. мед. наук, старш. науч. сотр. НИИ атеросклероза  
 Банфи Кристина, д-р наук, зав. лаб., Кардиологический центр им. Монзини  
 Шишкин Сергей Сергеевич, д-р биол. наук, проф. зав. лаб. ФГБУН ИНБИ РАН  
 Орехов Александр Николаевич, д-р биол. наук, проф. зав. лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН

М.А. Сазонова<sup>1,2,3</sup>, С.Д. Нурбаев<sup>3</sup>, М.М. Чичёва<sup>1,3</sup>,  
К.Ю. Митрофанов<sup>1,3</sup>, А.Н. Орехов<sup>1,3</sup>, А.Ю. Постнов<sup>2</sup>, И.А. Собенин<sup>1,2,3</sup>

## Детекция митохондриальных мутаций генов цитохромов В и С в липофиброзных бляшках интимы аорты человека (сообщение 1)

<sup>1</sup> ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

<sup>2</sup> ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс»

Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт атеросклероза, 143025, Москва, Инновационный Центр Сколково, ул. Новая, д. 100

*В настоящей работе проведена пилотная детекция уровня гетероплазмы десяти мутаций митохондриальных генов, кодирующих цитохромы В и С, в липофиброзных бляшках и нормальной интиме аорты человека. Установлено, что соматические мутации митохондриального генома G14846A и G15059A, локализованные в гене, кодирующем цитохром В, одном из ключевых ферментов дыхательной цепи, ассоциированы с липофиброзными бляшками интимы аорты человека. Это позволяет предположить, что генетический дефект цитохрома В может вызывать окислительный стресс в интиме аорты, приводящий к локальному возникновению атеросклеротических поражений.*

**Ключевые слова:** митохондриальная мутация, гетероплазмия, атеросклероз, интима, липофиброзная бляшка, ген цитохрома В

М.А. Sazonova<sup>1,2,3</sup>, S.D. Nurbaev<sup>3</sup>, M.M. Chicheva<sup>1,3</sup>, K.Yu. Mitrofanov<sup>1,3</sup>,  
A.N. Orekhov<sup>1,3</sup>, A.Yu. Postnov<sup>2</sup>, I.A. Sobenin<sup>1,2,3</sup>

## Detection of mitochondrial mutations in genes of cytochromes B and C in lipofibrous plaques in intima of human aortas

<sup>1</sup> Institute for General Pathology and Pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

<sup>2</sup> Russian Cardiology Research and Production Complex, 15a, 3rd Cherepkovskaya str., Moscow, 121552, Russia

<sup>3</sup> Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Centre, Moscow, Russian Federation, 100, Novaya str., Moscow, 143025, Russia

*In the present study a pilot detection of heteroplasmy level of ten mutations in mitochondrial genes, coding cytochrome B and C in lipofibrous plaques and normal intimas of human aortas was held. It is revealed, that somatic mutations of mitochondrial genome G14846A and G15059A localized in a gene coding cytochrome B, one of the key enzymes of respiratory chain, are associated with the presence of atherosclerotic plaques in intima of human aorta. It can be suggested that genetic defects of cytochrome B may cause oxidative stress in intima aorta resulting in development of local atherosclerotic lesions.*

**Key words:** mitochondrial mutation, heteroplasmy, atherosclerosis, intima, lipofibrous plaque, gene of cytochrome B

В основе развития многих сердечно-сосудистых заболеваний, преобладающих среди причин смерти людей в XXI веке, лежат атеросклеротические поражения интимы сосудов. Выявление молекулярно-генетических механизмов атеросклероза может помочь при ранней диагностике и своевременной профилактике атеросклероза.

В течение жизни индивида в митохондриальном геноме могут возникать соматические мутации. Их пенетран-

тность и экспрессивность зависит от уровня гетероплазмы. Поэтому при изучении ассоциации митохондриальных мутаций с заболеваниями человека необходима количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома [2—5, 7—10, 12—15, 23, 26, 28].

В настоящей работе проведена пилотная детекция уровня гетероплазмы десяти мутаций митохондриальных генов, кодирующих цитохромы В и С, в липофиброзных бляшках и нормальной интиме аорты человека.

Как известно из литературных источников, данные мутации ассоциированы с митохондриальными миопатиями, парциальными эпилептическими припадками, молочнокислым ацидозом, замедленным ростом и некоторыми другими патологиями человека [18, 21, 30].

**Для корреспонденции:** Сазонова Маргарита Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ФГБУ «НИИОПП» РАМН, ФГУ «РКНПЦ» Минздравсоцразвития РФ, НИИ атеросклероза. E-mail: daisy29@mail.ru

### Методика

Материалом исследования служили образцы ткани из интимы аорты семи лиц, погибших в результате несчастного случая или внезапной смерти.

Митохондриальную ДНК выделяли из образцов с помощью набора AQUAPURE GENOMIC TISSUE KIT фирмы BioRad, следуя соответствующим протоколам.

Аmplификацию фрагментов, содержащих область мутаций, осуществляли со праймерами, приведенными в табл. 1.

Режим ПЦР и размер амплификатов указаны в табл. 2.

Пироквенирование амплификатов проводили на автоматическом пироквенираторе PSQTMHS96MA [16, 17, 19, 25, 29, 31].

Праймеры для ПЦР и пироквениса подбирались с помощью программы Primer3 [22].

Визуализация результатов осуществлялась на основе программы, прилагающейся при установке пироквениатора, с помощью нового оригинального метода, разработанного авторами [6, 11, 27].

Для подсчета процента гетероплазии мутаций по данным пирогаммы используется ранее разработанная авторами формула [11]:

$$P = \frac{|h - N|}{|M - N|} \cdot 100\%,$$

где:

$P$  — процент гетероплазии;

$h$  — высота пика исследуемого нуклеотида;

$N$  — высота пика исследуемого нуклеотида, соответствующая наличию в образце 100% нормальных аллелей;

$M$  — высота пика исследуемого нуклеотида, соответствующая наличию в образце 100% мутантных аллелей.

Праймеры для ПЦР и пироквениса [2—5, 7—10, 12—15, 23, 26, 28]

Таблица 1

Ген	Мутация	Прямой праймер для ПЦР	Обратный праймер для ПЦР	Сиквенс-праймер
Ген субъединицы 1 цитохром-С-оксидазы	C6489A	GGGCCATCAATTTTCAT CACAACAA (6382—6405)	bio-CAGCAGCTAGGACT GGGAGAGATAGGA (6516—6490)	AATCAGCAGCTCCTACT (6470—6487)
Ген субъединицы 3 цитохром-С-оксидазы	G9379A	bio-CACTAACCATATA CCAATGA (9358—9377)	CTCCTGATGCGAGTAA TACGGATGT (9630—9605)	TCTCGTGTACATCGC (9397—9382)
	9480del15			TGGTAAAAGGCTCAGAA (9514—9498)
	9537delC			CCAGTGCCCTCCTAAT (9554—9539)
Ген цитохрома В	G14846A	bio-CATTATCTCGCA CGGACT (14671—14689)	GCTATAGTTGCAAGCAGGAG (15120—15100)	GCGCCAAGGAGTGA (14861—14848)
	G15059A			TTTCTGAGTAGAGAAATGAT (15080—15061)
	G15084A			GGATAATGCCGATGTT (15101—15086)
	C15452A	bio-ACCTTCCACCC TТАCTACA (15401—15419)	TGTAGGCGAATAGGAAATATC (15581—15561)	ATGTCATTAAGGAGAGAA (15470—15453)
	del 15498 to 15521			GTGTTTAAGGGGTTGG (15537—15522)
	G15762A	GCCCGAATGATATTTTCCTAT (15553—15572)	Bio-GCTTTGGGTGC TAATGGTGG (15996—15977)	TCATTCTAACCTGAATCG (15744—15761)

Условия для ПЦР фрагментов митохондриального генома

Таблица 2

Мутации	Размер ПЦР-фрагмента	Концентрация MgCl <sub>2</sub> в буфере для ПЦР	Денатурация	Отжиг	Синтез
G9379A, 9480del15, 9537delC	273 п.н.	2,5 мМ	94°	55°	72°
G14846A, G15059A, G15084A	450 п.н.	1,5 мМ			
C15452A, del 15498 to 15521	181 п.н.	2,5 мМ			
G15762A	444 п.н.	1,5 мМ	94°	50°	72°
C6489A	135 п.н.	1,5 мМ			

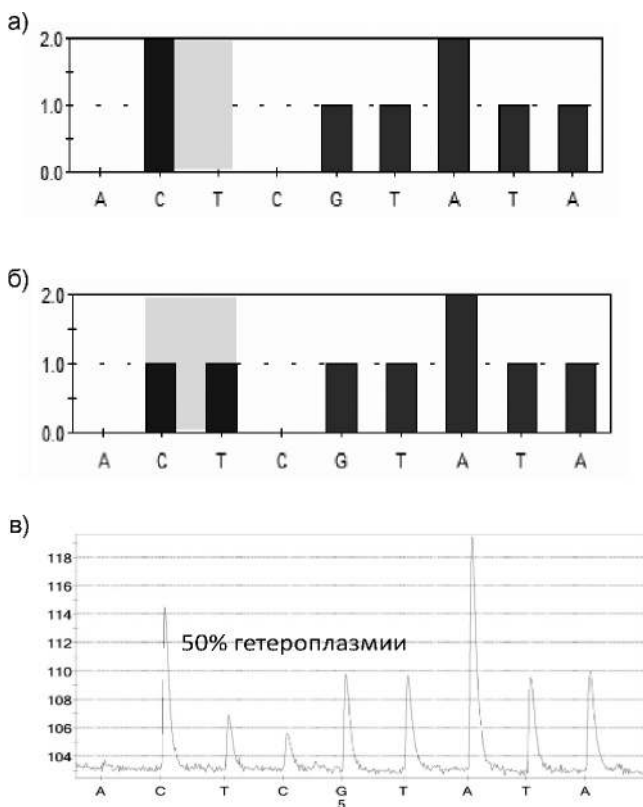


Рис. 1. Детекция уровня гетероплазии мутации G15059A (C→T при использовании обратного праймера для сиквенса): 1 — 100% гомоплазия по нормальному аллелю C; 2 — 100% гомоплазия по мутантному аллелю T; 3 — 50% гетероплазия по мутантному аллелю T

Например, согласно данной формуле, процент гетероплазии по мутации G15059A (C→T при использовании обратного праймера для сиквенса) в образце ДНК 50-летнего пациента составил 50% (рис. 1).

В работе был использован бутстрэп-анализ для выявления статистически достоверных ассоциаций исследуемых мутаций с липофиброзными бляшками артерии человека [1, 20, 24].

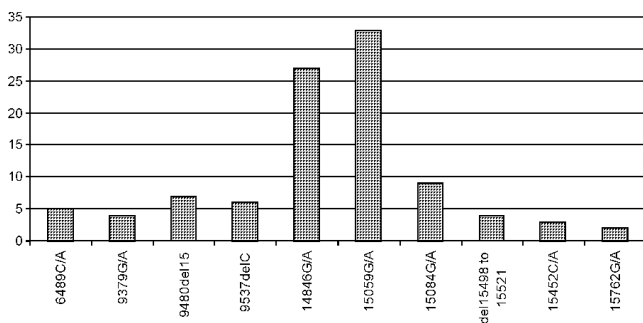


Рис. 2. Результаты бутстрэп-анализа по 10 мутациям гена цитохрома В (пояснение в тексте).

## Результаты и обсуждение

В результате бутстрэп анализа методом повторных выборок выявлены ассоциации двух из десяти исследуемых мутаций, с порогом встречаемости более 25% на 1000 бутстрэп-выборках, для остальных мутаций порог встречаемости оказался менее 8% (рис. 2). В дальнейшем были проанализированы уровни гетероплазии. Согласно полученным данным, уровень гетероплазии мутаций G14846A и G15059A был значительно выше в липофиброзных бляшках по сравнению с нормальной сосудистой тканью в 43% аорт. По остальным восьми митохондриальным мутациям достоверных различий между нормой и патологией не обнаружено.

Обе мутации были ранее выявлены у пациентов с митохондриальными миопатиями. Каждая вызывает определенную аминокислотную замену в цитохроме В. Мутация G14846A снижает активность фермента, в то время мутация G15059A является нонсенс-мутацией, вызывающей образование стоп-кодона, в результате которого происходит потеря 244 аминокислотных остатков цитохрома В.

## Заключение

Соматические мутации митохондриального генома G14846A и G15059A, локализованные в гене, кодирующем цитохром В, одном из ключевых ферментов дыхательной цепи, ассоциированы с липофиброзными бляшками интимы артерии человека. Это позволяет предположить, что генетический дефект цитохрома В может вызывать окислительный стресс в интиме артерии, приводящий к локальному возникновению атеросклеротических поражений.

Данная информация может быть полезна для выявления группы риска, проведения ранней и своевременной диагностики и медико-генетическое консультирование отягощенных атеросклерозом семей практикующими врачами и медицинскими генетиками.

*Работа поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации.*

## Список литературы

1. Вейр Б. Анализ генетических данных / Пер. с англ. — М.: Мир, 1995. — 400 с., ил.
2. Желанкин А.В., Сазонова М.А. Роль мутаций митохондриального генома человека в развитии сахарного диабета 2 типа, артериальной гипертензии и различных видов кардиомиопатии // Проблемы и перспективы современной науки. — 2011. — Т. 3, №1. — С. 85—87.



3. **Иванова М.М., Сазонова М.А., Желанкин А.В.** и др. Мутации митохондриального генома в патологии человека // *Фундаментальные науки и практика*. — 2010. — Т. 1, №4. — С. 164—167.
4. **Митрофанов К.Ю., Сазонова М.А.** Связь мутаций митохондриального генома человека с клиническими проявлениями ишемической болезни сердца // *Проблемы и перспективы современной науки*. — 2011. — Т.3, №1. — С.92—96.
5. **Сазонова М.А., Желанкин А.В., Иванова М.М.** и др. Анализ мутации митохондриального генома A1555G при атеросклерозе интимы аорты человека // *Современный мир, природа и человек*. — 2011. — Т. 2, №1. — С. 67—69.
6. **Сазонова М.А., Иванова М.М., Желанкин А.В.** и др. Прямая количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома // *Фундаментальные науки и практика*. — 2010. — Т. 1, №2. — С. 19—21.
7. **Сазонова М.А., Иванова М.М., Желанкин А.В.** и др. Ассоциация мутации митохондриального генома 652INSG с атеросклеротическими поражениями человека // *Фундаментальные науки и практика*. — 2010. — Т. 1, №4. — С. 168—171.
8. **Сазонова М.А., Иванова М.М., Желанкин А.В.** и др. Детекция мутации митохондриального генома человека 652insG при атеросклеротических поражениях сосудов человека // *Молекулярная диагностика-2010: Сб. трудов VII всероссийской научно-практической конференции с международным участием*. — 2010. — Т. 5. — С. 109—112.
9. **Сазонова М.А., Иванова М.М., Желанкин А.В.** и др. Детекция митохондриальной делеции гуанина в позиции 652 при атеросклеротических поражениях человека // *Проблемы и перспективы современной науки*. — 2011. — Т. 3, №1. — С. 105—107.
10. **Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Собенин И.А., Орехов А.Н.** Патентная заявка «Способ количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома в лейкоцитах крови человека». Входящий №065647, регистрационный №2009146012, от 14.12.2009.
11. **Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н., Собенин И.А.** Новый метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома // *Пат. физиол. экспер. тер.* — 2011. — №4. — С. 82—85.
12. **Собенин И.А., Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н.** Патентная заявка от 10.08.2010 «Способ генетической диагностики предрасположенности к атеросклерозу», регистрационный №2010133468.
13. **Собенин И.А., Мясоедова В.А., Сазонова М.А.** и др. Разработка метода комплексной оценки риска развития сердечно-сосудистых заболеваний и их осложнений на основе анализа генотипа и фенотипа // *Сб. тезисов. Итоговая конференция по результатам выполнения мероприятий за 2009 год в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007—2012 годы»*. — М.: 25—27 ноября 2009 г. — С. 134—135.
14. **Собенин И.А., Сазонова М.А., Мясоедова В.А.** и др. Полиморфизм 3256C/T митохондриальной ДНК как маркер ишемической болезни сердца и атеросклероза // *Проблемы и перспективы современной науки*. — 2011. — Т. 3, №1. — С. 108—110.
15. **Собенин И.А., Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Романенко Е.Б., Орехов А.Н.** Патентная заявка от 11.10.2010 «Способ генодиагностики сердечно-сосудистых заболеваний», регистрационный №2010141594.
16. **Agaton C., Unneberg P., Sievertzon M.** et al. Gene expression analysis by signature pyrosequencing // *Gene*. — 2002. — Vol. 289. — №1—2. — P. 31—39.
17. **Alderborn A., Kristofferson A., Hammerling U.** Determination of single-nucleotide polymorphisms by real-time pyrophosphate DNA sequencing // *Genome Res.* — 2000. — №10. — P. 1249—1258.
18. **Andreu A.L., Hanna M.G., Reichmann H.** et al. Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA // *N. Engl. J. Med.* — 1999. — Sep. — Vol. 341, №14. — P. 1037—1044.
19. **Chen D.C., Saarela J., Nuotio I.** et al. Comparison of GenFlex Tag array and Pyrosequencing in SNP genotyping // *J. Mol. Diagn.* — 2003. — №5. — P. 243—249.
20. **Efron B.** The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. CBMS-NSF Regional Conference Series in Applied Mathematics, Monograph 38, SIAM, Philadelphia, 1982.
21. **Horvath R., Scharfe C., Hoeltzenbein M.** et al. Childhood onset mitochondrial myopathy and lactic acidosis caused by a stop mutation in the mitochondrial cytochrome c oxidase III gene // *J. Med. Genet.* — 2002. — Nov. — Vol. 39, №11. — P. 812—816.
22. <http://simgene.com/Primer3>
23. **Postnov A.Y., Sazonova M.A., Budnikov Y.Y.** et al. Association of somatic mitochondrial mutations with atherosclerosis. 76<sup>th</sup> Congress of the European Atherosclerosis Society, Helsinki, Finland, June 10—13, 2007. *Atherosclerosis Suppl.* — 2007. — 8(1). — P. 46.
24. **Quenouille M.** Notes on bias in estimation // *Biometrika*. — 1956. — 43. — P. 253—260.
25. **Ronaghi M.** Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing // *Genome Reseach.* — 2001. — №11. — P. 3—11.
26. **Sazonova M., Andrianova I., Khasanova Z.** et al. Quantitative mitochondrial genome mutation investigation and possible role of the somatic mutations in development of atherosclerotic lesion of human aorta // 77<sup>th</sup> Congress of European Atherosclerosis Society, Istanbul, Turkey, April 26—29, 2008 // *Atherosclerosis Suppl.*, 2008. — Vol. 9(1). — P. 113.
27. **Sazonova M.A., Budnikov Y.Y., Khazanova Z.B.** et al. Direct quantitative assessment of mutant allele in mitochondrial genome in atherosclerotic lesion of human aorta // 76<sup>th</sup> Congress of the European Atherosclerosis Society, Helsinki, Finland, June 10—13, 2007, *Atherosclerosis Suppl.* — 2007. — Vol. 8(1). — P. 45—46.
28. **Sazonova M.A., Budnikov Ye.Ye., Khazanova Z.B.** et al. Possible role of somatic mitochondrial mutations in the development of atherosclerotic lesion of human aorta // ACC 57<sup>th</sup> Annual Scientific Session, Chicago, USA, March 29 — April 1, 2008 // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2008. — Vol. 51(10). — Suppl.A. — A285.
29. **Sinclair A., Arnold C., Woodford N.** Rapid detection and estimation by pyrosequencing of 23S rRNA genes with a single nucleotide polymorphism conferring linezolid resistance in Enterococci // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2003. — Vol. 47. — P. 3620—3622.
30. **Varlamov D.A., Kudin A.P., Vielhaber S.** et al. Metabolic consequences of a novel missense mutation of the mtDNA CO I gene // *Hum. Mol. Genet.* — 2002. — Aug. — Vol. 11, №16. — P. 1797—1805.
31. **Wasson J., Scolnick G., Love-Gregory L.** et al. Assessing allele frequencies of single nucleotide polymorphisms in DNA pools by pyrosequencing technology // *BioTechniques*. — 2002. — Vol. 32. — P. 1144—1452.

Поступила 14.08.12

**Сведения об авторах:**

*Нурбаев Серик Долдашевич*, в.н.с., Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково, Москва, Россия

*Чичёва Мария Михайловна*, м.н.с., Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии Российской академии медицинских наук (Москва);

Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково, Москва, Россия

*Митрофанов Константин Юрьевич*, м.н.с., Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии Российской академии медицинских наук;

Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково, Москва, Россия

*Орехов Александр Николаевич*, профессор, д.б.н., зав. лабораторией механизмов атерогенеза НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН;

Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково, Москва, Россия, 143025, Московская обл., Одинцовский район, дер.Сколково, ул.Новая, д.100, оф. 24, 25

*Постнов Антон Ювенальевич*, д.м.н., зав. лабораторией медицинской генетики Института клинической кардиологии ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздравсоцразвития России

*Собенин Игорь Александрович*, д.м.н., в.н.с., Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8;

ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздравсоцразвития России, Москва, 121552, ул. 3-я Черепковская, д.15а;

Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково, Москва, Россия, 143025, Московская обл., Одинцовский район, дер.Сколково, ул. Новая, д.100, оф. 24, 25

М.А. Сазонова<sup>1,2,3</sup>, В.В. Синёв<sup>3</sup>, М.М. Чичёва<sup>1,3</sup>, К.Ю. Митрофанов<sup>1,3</sup>,  
А.В. Желанкин<sup>1,3</sup>, А.Н. Орехов<sup>1,3</sup>, И.А. Собенин<sup>1,2,3</sup>

## Ассоциация гетероплазмии мутаций митохондриальных генов РНК с гомогенатами пораженной атеросклерозом интимы аорты (сообщение 2)

<sup>1</sup> ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

<sup>2</sup> ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а.2

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт атеросклероза, 143025, Москва, Инновационный Центр Сколково, ул. Новая, д.100

В настоящей работе представлен сравнительный анализ уровня гетероплазмии 4 мутаций митохондриального генома в образцах ДНК, выделенных из тотальных гомогенатов нормальной и пораженной атеросклерозом интимы 10 аорт лиц, погибших в результате несчастного случая или внезапной смерти. Обнаружено, что в исследованных аортах уровень гетероплазмии мутантного аллеля A1555G и G12315A в гомогенатах атеросклеротического поражения значительно выше по сравнению с тотальными гомогенатами из нормальной интимы.

**Ключевые слова:** митохондриальная мутация, гомогенат, интима, аорта, гетероплазмия, атеросклероз, липофибровая бляшка, ген, РНК

М.А. Sazonova<sup>1,2,3</sup>, V.V. Sinyov<sup>1,3</sup>, M.M. Chicheva<sup>1,3</sup>, K.Yu. Mitrofanov<sup>1,3</sup>,  
A.V. Zhelankin<sup>1,3</sup>, A.N. Orekhov<sup>1,3</sup>, I.A. Sobenin<sup>1,2,3</sup>

## The association of heteroplasmy of mutations in mitochondrial RNA genes with homogenates of intima aorta affected with atherosclerosis

<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 paper a comparative analysis of the heteroplasmy level of 4 mitochondrial genome mutations in DNA samples isolated from total homogenates of 10 normal and affected with atherosclerosis intima of aortas of people, who died in a result of an accident or a sudden death, is represented. It was found that the heteroplasmy level of the mutant allele A1555G and G12315A in homogenates of atherosclerotic lesions is significantly higher compared to total homogenates from normal intima of in the investigated aortas.

**Key words:** mitochondrial mutation, homogenate, intima, aorta, heteroplasmy, atherosclerosis, lipofibrous plaque, gene, RNA

Сердечно-сосудистые заболевания ССЗ, среди которых преобладает ишемическая болезнь сердца ИБС, являются основной причиной смертности в большинстве экономически развитых стран мира. В настоящее время распространенность ИБС в России составляет  $13,5 \pm 0,1\%$ , в том числе среди мужчин —  $14,3 \pm 0,3\%$ , среди женщин —  $13,0 \pm 0,2\%$ . Это в 3 раза превышает аналогичные показатели в США, где распространенность ИБС по данным

Американской ассоциации сердца, составляла в 2004 г. лишь  $4,9\%$ . Распространенность ИБС увеличивается с возрастом, и в нашей стране составляет более  $50\%$  среди населения старше 70 лет [12].

В основе развития многих сердечно-сосудистых заболеваний лежит атеросклероз. Вследствие этого большое значение имеет ранняя, досимптоматическая диагностика атеросклероза, в том числе молекулярно-генетическими методами.

Соматические мутации митохондриального генома человека могут быть одной из возможных причин возникновения и развития этого грозного заболевания XXI века [1, 2—5].

**Для корреспонденции:** Сазонова Маргарита Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН, ФГБУ «РКНПЦ» Минздрава РФ, НИИ атеросклероза. E-mail: daisy29@mail.ru

Митохондриальная ДНК человека представлена одной кольцевой молекулой ДНК размером 16 569 пар нуклеотидов (рис. 1). Она состоит из 37 генов и кодирует 13 белков, 22 транспортные рРНК, две рибосомальные рРНК [3].

*Цель работы* — пилотный анализ ассоциации гетероплазмии четырех мутаций митохондриальных генов рРНК человека с гомогенатами пораженной атеросклерозом интимы аорты. По данным литературы, эти мутации ассоциированы с митохондриальными миопатиями, MELAS, офтальмоплегией, глухотой, энцефалопатией, лактоцидозом, кардиомиопатией и некоторыми другими заболеваниями людей [13, 14, 17, 18].

### Методика

В качестве материала исследования были использованы тотальные гомогенаты интимы аорты лиц, погибших в результате несчастного случая или внезапной смерти. Все пораженные атеросклерозом участки интимы аорты гомогенизировали, тщательно перемешивали и брали 10 мкг ткани для выделения ДНК. Таким же способом получали гомогенаты интимы нормальных участков аорты. Для исследования было взято 10 аорт.

Выделение тотальной ДНК из образцов ткани проводилось с помощью метода фенол-хлороформной экстракции. После проведения ПЦР амплификаты были пиросеквенированы с целью выявления процента гетероплазмии по интересующим нас мутациям.

Амплификацию фрагментов, содержащих область мутаций, осуществляли с праймерами, приведенными в табл. 1.



Рис. 1. Схема митохондриальной ДНК человека [3]

Режим ПЦР и размер амплификатов указаны в табл. 2.

Анализ последовательности ДНК, для определения доли мутантного аллеля митохондриальной ДНК в гетероплазмической смеси, осуществляли с использованием технологии пиросеквенирования в режиме реального времени. Исследования проводили на автоматическом пиросекваторе PSQ96MA [16].

Праймеры для ПЦР и пиросеквенирования были подобраны с помощью онлайн программы Primer3 [15].

Таблица 1

Праймеры для ПЦР и пиросеквенса

Ген	Мутация	Прямой праймер для ПЦР	Обратный праймер для ПЦР	Праймер для секвенса
Ген рРНК 12S	652insG	TAGACGGGCTCACATCAC (621–638)	bio-GGGGTATCTAATCCC AGTTTGGGT (1087–1064)	CCCATAAACAAATA (639–651)
	A1555G	TAGGTCAAGGTGTAGCCCA TGAGGTGGCAA (1326–1355)	bio-GTAAGGTGGAGTGGGTTTGGG (1704–1684)	ACGCATTTATATAGAGGA (1537–1554)
Ген тРНК-Leu (кодон узнавания UUR)	C3256T	bio-AGGACAAGAGAAA TAAGGCC (3129–3149)	ACGTTGGGGCCTTTGCGTAG (3422–3403)	AAGAAGAGGAATTGA (3300–3286)
Ген тРНК-Leu (кодон узнавания CUN)	G12315A	bio-CTCATGCCCCCATGTCTAA (12230–12249)	TTACTTTTATTGGAGTTGCAC (12337–12317)	TTGGAGTTGCAC (1228–1216)

Таблица 2

Условия для ПЦР фрагментов митохондриального генома

Мутации	Размер ПЦР-фрагмента	Концентрация MgCl <sub>2</sub> в буфере для ПЦР	Денатурация	Отжиг	Синтез
652insG	467 п.н.	2,5 мМ	94°	60°	72°
C3256T	294 п.н.	2,5 мМ	94°	55°	72°
A1555G	379 п.н.	2,5 мМ	94°	50°	72°
G12315A	108 п.н.	2,5 мМ			

Расчет величины процента гетероплазмы по мутациям проводился на основе пиков, соответствующих интенсивности люминисценции при последовательном встраивании различных нуклеотидов в цепь анализируемого фрагмента. Данный оригинальный количественный метод оценки мутантного аллеля был разработан в нашей лаборатории на базе метода SNP-анализа [6—11, 19—23].

### Результаты и обсуждение

В настоящей работе в тотальных гомогенатах нормальной и пораженной атеросклерозом интимы аорт человека был проанализирован уровень гетероплазмы мутаций в рРНК- и тРНК-кодирующих генах: мутация 652insG и A1555G в 12S рРНК; C3256T — в тРНК — лейцин, кодон узнавания UUR; G12315A — в тРНК — лейцин, кодон узнавания CUN.

Обнаружены две мутации, процент которых значительно выше в гомогенатах пораженной интимы по сравнению с гомогенатами нормальной интимы аорты (рис. 2).

Согласно данным, представленным на рис. 2, уровень гетероплазмы в гомогенатах атеросклеротического поражения интимы в несколько раз выше по сравнению с гомогенатами нормальной сосудистой ткани. Следует отметить статистическую достоверность отличий в гомогенатах аорт В1, В10 и В8 30% исследованных сосудов. Наиболее значительная разница между пораженным атеросклерозом и нормальным гомогенатом отмечается в образцах В1 в 8,5 раз и В10 в 16 раз по мутации A1555G и образце В8 в 3,7 раза по мутации G12315A.

Планируется дальнейшее расширение выборки для возрастания достоверности результатов.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что соматические митохондриальные мутации A1555G (ген 12S рРНК) и G12315A (ген тРНК-лейцин, кодон узнавания CUN) ассоциированы с атеросклерозом. Это позволяет сделать предположение о том, что данные мутации способствуют замедлению или прекращению синтеза ферментов дыхательной цепи митохондрий, что может привести к окислительному стрессу в клетках интимы аорты, и, в дальнейшем, возникновению и развитию атеросклероза.

Данная статья может быть полезна клиницистам, занимающимся диагностикой атеросклероза, и ученым, изучающим молекулярно-генетические механизмы атерогенеза.

*Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.*

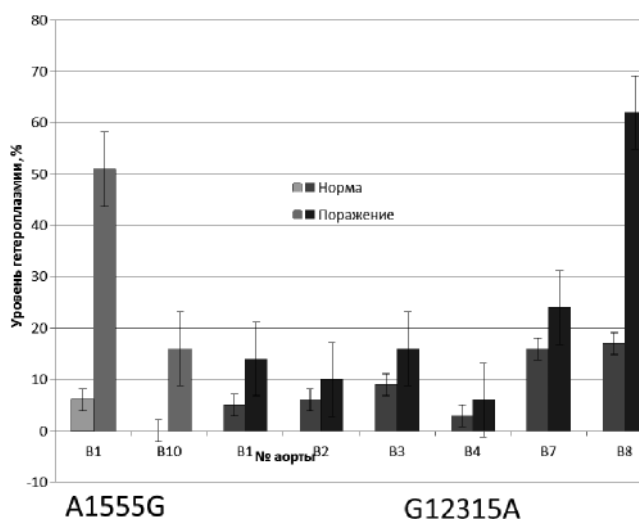


Рис. 2. Частота мутации A1555G и G12315A в гомогенатах интимы аорт

### Список литературы

1. Желанкин А.В., Сазонова М.А. Роль мутаций митохондриального генома человека в развитии сахарного диабета 2 типа, артериальной гипертензии и различных видов кардиомиопатии // Проблемы и перспективы современной науки. — 2011. — Т. 3, №1. — С. 85—87.
2. Иванова М.М., Сазонова М.А., Желанкин А.В. и др. Мутации митохондриального генома в патологии человека // Фундаментальные науки и практика. — 2010. — Т. 1, №4. — С. 164—167.
3. Игамбердиев А.У. Уникальная генетическая система митохондрий // Соросовский образовательный журнал. — 2000. — Т. 6, №1. — С. 34.
4. Митрофанов К.Ю., Желанкин А.В., Сазонова М.А. и др. Хронические заболевания невоспалительного генеза и мутации митохондриального генома человека // Кардиологический вестник. — 2012. — 7 19, 1. — С. 57—61.
5. Митрофанов К.Ю., Сазонова М.А. Связь мутаций митохондриального генома человека с клиническими проявлениями ишемической болезни сердца // Проблемы и перспективы современной науки. — 2011. — Т. 3, №1. — С. 92—96.
6. Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н., Собенин И.А. Новый метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома // Пат. физиол. Экспер. тер. — 2011. — №4. — С. 82—85.
7. Сазонова М.А., Иванова М.М., Желанкин А.В. и др. Прямая количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома // Фундаментальные науки и практика. — 2010. — Т. 1, №2. — С. 19—21.
8. Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Собенин И.А., Орехов А.Н. Патентная заявка «Способ количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома в лейкоцитах крови человека». Входящий №065647, регистрационный №2009146012, от 14.12.2009.
8. Собенин И.А., Сазонова М.А., Постнов А.Ю. и др. Патентная заявка от 9.10.2010 «Способ генодиагностики сердечно-сосудистых заболеваний», регистрационный №2010141594.

10. *Собенин И.А., Мясоедова В.А., Сазонова М.А.* и др. Разработка метода комплексной оценки риска развития сердечно-сосудистых заболеваний и их осложнений на основе анализа генотипа и фенотипа: Сб. тезисов. Итоговая конференция по результатам выполнения мероприятий за 2009 год в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы». — М.: 25–27 ноября 2009. — С. 134–135.
11. *Собенин И.А., Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н.* Патентная заявка от 10.08.2010 «Способ генетической диагностики предрасположенности к атеросклерозу», регистрационный №20101133468.
12. *Шальнова С.А., Деев А.Д.* Ишемическая болезнь сердца в России: распространенность и лечение по данным клинико-эпидемиологических исследований // Терапевтический архив. — 2011. — Т. 83. №1. — С. 1.
13. *Cheng-Bo Han, Jia-Ming Ma, Yan Xin* et al. Mutations of mitochondrial 12S rRNA in gastric carcinoma and their significance // World J. Gastroenterol. — 2005. — Vol. 11, №1. — P. 31–35.
14. *Fu K., Hartlen R., Johns T.* et al. A novel heteroplasmic tRNA<sup>Leu</sup>CUN mtDNA point mutation in a sporadic patient with mitochondrial encephalomyopathy segregates rapidly in skeletal muscle and suggests an approach to therapy // Human Molecular Genetics. — 1996. — Vol. 5, №111. — P. 1835–1840.
15. <http://simgene.com/Primer3>
16. <http://www.qiagen.com/products/pyromarkq96id.aspx>
17. *Jeppesen T.D., Schwartz M., Hansen K.* Late onset of stroke-like episode associated with a 3256C→T point mutation of mitochondrial DNA // J. of the Neurological Sciences. — 2003. — Vol. 214. — P. 17–20.
18. *Li R., Xing G., Yan M.* et al. 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. — Jan. 15. — 124A, №2. — P. 113–117.
19. *Sazonova M.A., Budnikov Y.Y., Khazanova Z.B.* et al. Direct quantitative assessment of mutant allele in mitochondrial genome in atherosclerotic lesion of human aorta // 76<sup>th</sup> Congress of the European Atherosclerosis Society, Helsinki, Finland, June 10–13, 2007 // Atherosclerosis Suppl. — 2007. — Vol. 8, №1. — P. 45–46.
20. *Sazonova M.A., Budnikov Y.Y., Khazanova Z.B.* et al. Studies of the human aortic intima by a direct quantitative assay of mutant alleles in the mitochondrial genome // Atherosclerosis. — 2009. — Vol. 204, №1. — P. 184–190.
21. *Postnov A.Y., Sazonova M.A., Budnikov Y.Y.* et al. Association of somatic mitochondrial mutations with atherosclerosis // 76<sup>th</sup> Congress of the European Atherosclerosis Society, Helsinki, Finland, June 10–13, 2007 // Atherosclerosis Suppl. — 2007. — Vol. 8, №1. — P. 46.
22. *Sazonova M., Andrianova I., Khasanova Z.* et al. Quantitative mitochondrial genome mutation investigation and possible role of the somatic mutations in development of atherosclerotic lesion of human aorta // 77<sup>th</sup> Congress of European Atherosclerosis Society, Istanbul, Turkey, April 26–29, 2008 // Atherosclerosis Suppl. — 2008. — Vol. 9, №1. — P. 113.
23. *Sazonova M.A., Budnikov Ye.Ye., Khazanova Z.B.* et al. Possible role of somatic mitochondrial mutations in the development of atherosclerotic lesion of human aorta // ACC 57<sup>th</sup> Annual Scientific Session, Chicago, USA, March 29 — April 1, 2008 // J. Am. Coll. Cardiol. — 2008. — Vol. 51, №10. — Suppl. A. — A285.

Поступила 24.10.12

#### Сведения об авторах:

*Синёв Василий Владимирович*, аспирант, лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН, НИИ атеросклероза

*Чичёва Мария Михайловна*, аспирант лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН, НИИ атеросклероза

*Митрофанов Константин Юрьевич*, аспирант, лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН, НИИ атеросклероза

*Желанкин Андрей Викторович*, аспирант лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН, НИИ атеросклероза

*Орехов Александр Николаевич*, д-р биол. наук, зав. лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН, НИИ атеросклероза

*Собенин Игорь Александрович*, д-р мед. наук, ФГБУ «НИИОПП» РАМН, ФГБУ «РКНПЦ» Минздрава РФ, НИИ атеросклероза

М.А. Сазонова<sup>1,2,3</sup>, В.В. Синёв<sup>3</sup>, М.М. Чичёва<sup>1,3</sup>, А.В. Желанкин<sup>1,3</sup>,  
К.Ю. Митрофанов<sup>1,3</sup>, А.Н. Орехов<sup>1,3</sup>, И.А. Собенин<sup>1,2</sup>

## **Анализ гетероплазмии некоторых генов субъединиц NADH дегидрогеназы в гомогенатах атеросклеротического поражения интимы аорты (сообщение 3)**

<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> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а.2

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт атеросклероза, 143025, Москва, Инновационный Центр Сколково, ул. Новая, 100

*Проведен сравнительный анализ уровня гетероплазмии четырех мутаций митохондриальных генов субъединиц 1, 2, 5 и 6 NADH дегидрогеназы в образцах ДНК, выделенных из тотальных гомогенатов нормальной и пораженной атеросклерозом интимы 10 аорт. Обнаружено, что в исследованных аортах уровень гетероплазмии мутаций C5178A и G14459A в гомогенатах с атеросклеротическим поражением значительно выше по сравнению с тотальными гомогенатами из нормальной интимы.*

**Ключевые слова:** митохондриальная мутация, гомогенат, интима, аорта, гетероплазмия, атеросклероз, липофиброзная бляшка, ген, NADH дегидрогеназа

М.А. Sazonova<sup>1,2,3</sup>, V.V. Sinyov<sup>1,3</sup>, M.M. Chicheva<sup>1,3</sup>, K.Yu. Mitrofanov<sup>1,3</sup>,  
A.V. Zhelankin<sup>1,3</sup>, A.N. Orekhov<sup>1,3</sup>, I.A. Sobenin<sup>1,2,3</sup>

## **The analysis of heteroplasmy of some subunits NADH dehydrogenase genes in homogenates of aortic intima atherosclerotic lesion**

<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

*A comparative analysis of heteroplasmy level of four mutations in mitochondrial genes of subunits 1, 2, 5 and 6 NADH dehydrogenase in DNA samples was carried out. The DNA samples were isolated from total homogenates of intima of 10 aortas affected with atherosclerosis and normal ones. It was found that the heteroplasmy level of mutations G14459A and C5178A in homogenates with atherosclerotic lesions is significantly higher compared to total homogenates from normal intima in the investigated aortas.*

**Key words:** mitochondrial mutation, homogenate, intima, aorta, heteroplasmy, atherosclerosis, lipofibrous plaque, gene, NADH dehydrogenase

Согласно данным медицинской статистики, ежегодно в России около 1 млн 300 тыс. чел. умирают от заболеваний сердечно-сосудистой системы, и каждый год этот показатель увеличивается приблизительно на 2—3%. Среди общей смертности в России сердечно-сосудистые заболевания составляют 57%.

В основе развития многих сердечно-сосудистых заболеваний лежит атеросклероз, поэтому большое

значение приобретает ранняя, досимптоматическая диагностика атеросклероза, в том числе, молекулярно-генетическими методами.

Одной из возможных причин атеросклероза могут быть соматические мутации митохондриального генома человека [1—3]. Как известно, митохондриальная ДНК человека представлена одной кольцевой молекулой ДНК размером 16 569 п.н. Она кодирует 13 белков, 22 транспортных РНК, две рибосомальные РНК. Следует отметить, что 60% генов, кодирующих митохондриальные белки, приходится на семь субъединиц ферментативного комплекса NADH-дегидрогеназы, остальные гены коди-

**Для корреспонденции:** Сазонова Маргарита Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ФГБУ «НИИОПП» РАМН, ФГУ «РКНПЦ» Минздравсоцразвития РФ, НИИ атеросклероза. E-mail: daisy29@mail.ru

руют две субъединицы АТФ-синтетазы, три субъединицы цитохромоксидазы, одну субъединицу убихинол-цитохром-с-редуктазы (цитохром b) [4].

В настоящей работе проведен пилотный анализ четырех мутаций митохондриального генома, локализованных в генах субъединиц 1, 2, 5 и 6 NADH дегидрогеназы, в общих гомогенатах нормальной интимы и атеросклеротического поражения аорт человека (табл. 1).

По данным литературы, большинство исследуемых нами мутаций вызывает образование дефектного белка субъединиц NADH дегидрогеназы, что приводит к полной дисфункции фермента дыхательной цепи митохондрий [10, 11, 13, 16].

### Методика

В качестве материала исследования были использованы тотальные гомогенаты интимы аорты лиц, погибших в результате несчастного случая или внезапной смерти. Все пораженные атеросклерозом участки интимы аорты гомогенизировали, тщательно перемешивали и брали 10 мкг ткани для выделения ДНК. Таким же способом получали гомогенаты интимы нормальных участков аорты. Для исследования было взято 10 аорт. Выделение тотальной ДНК из образцов ткани проводилось с помощью метода фенол-хлороформной экстракции. После проведения ПЦР амплификаты были пиросеквенированы с целью выявления процента гетероплазмии по интересующим нас мутациям. Амплификацию фрагментов, содержащих область мутаций, осуществляли с праймерами, приведенными в табл. 1. Режим ПЦР и размер амплификатов указаны в табл. 2.

Анализ последовательности ДНК, для определения доли мутантного аллеля митохондриальной ДНК в гетероплазмической смеси, осуществляли с использованием технологии пиросеквенирования в режиме реального времени. Исследования проводили на автоматическом пиросекваторе PSQ96MA. Праймеры для ПЦР и пиросеквенирования были подобраны с помощью онлайн программы Primer3 [12].

Расчет величины процента гетероплазмии по мутациям проводился на основе пиков, соответствующих интенсивности люминисценции при последовательном встраивании различных нуклеотидов в цепь анализируемого фрагмента. Данный оригинальный количественный метод оценки мутантного аллеля был разработан в нашей лаборатории на базе метода SNP-анализа [5—9, 14, 15].

### Результаты и обсуждение

С целью выявить мутации, ассоциированные с атеросклерозом, был проведен анализ однонуклеотидных замен T3336C, C5178A, G13513A и G14459A в митохондриальных генах 1, 2, 5 и 6 субъединиц NADH дегидрогеназы, выявленных ранее при различных патологиях, таких как стеноз коронарных сосудов, диабет, глухота, инфаркт миокарда и кардиомиопатии [9—12]. Данные мутации предварительно были отобраны нами при исследовании отдельных липофиброзных бляшек интимы аорт человека [13]. В настоящей работе были исследованы ПЦР-фрагменты ДНК, выделенные из общих гомогенатов пораженной и нормальной интимы 10 аорт, с целью выявить средний процент гетероплазмии выбранных нами мутаций в каждой аорте.

Таблица 1

Праймеры

Ген	Мутация	Прямой праймер для ПЦР	Обратный праймер для ПЦР	Праймер для секвенса
Ген субъединицы 1 NADH-дегидрогеназы	T3336C	bio-AGGACAAGAGAAA TAAGGCC (3129—3149)	ACGTTGGGGCCTTT GCGTAG (3422—3403)	TGCGATTAGAATGGGTAC (3354—3337)
Ген субъединицы 2 NADH-дегидрогеназы	C5178A	bio-GCAGTTGAGGTGG ATTAAC (4963—4982)	GGAGTAGATTAGGCGTA GGTAG (5366—5345)	ATTAAGGGTGTTAGTCATGT (5200—5181)
Ген субъединицы 5 NADH-дегидрогеназы	G13513A	CCTCACAGGTTTCTACT CCAAA (13491—13512)	bio-AAGTCCTAGGAAAGTGA CAGCGAGG (13825—13806)	AGGTTTCTACTCCAA (13497—13511)
Ген субъединицы 6 NADH-дегидрогеназы	G14459A	CAGCTTCTACACTATT AAAGT (14303—14334)	bio-GTTTTTTTAAATTTATTT AGGGGG (14511—14489)	GATACTCCTCAATAGCCA (14439—14456)

Таблица 2

Условия для ПЦР

Мутации	Размер ПЦР-фрагмента	Концентрация MgCl <sub>2</sub> в буфере для ПЦР	Денатурация	Отжиг	Синтез
C5178A	383 п.н.	2,5 мМ	94°	60°	72°
T3336C	294 п.н.	2,5 мМ	94°	55°	72°
G13513A	335 п.н.	1,5 мМ			
G14459A	209 п.н.	1,5 мМ	94°	50°	72°



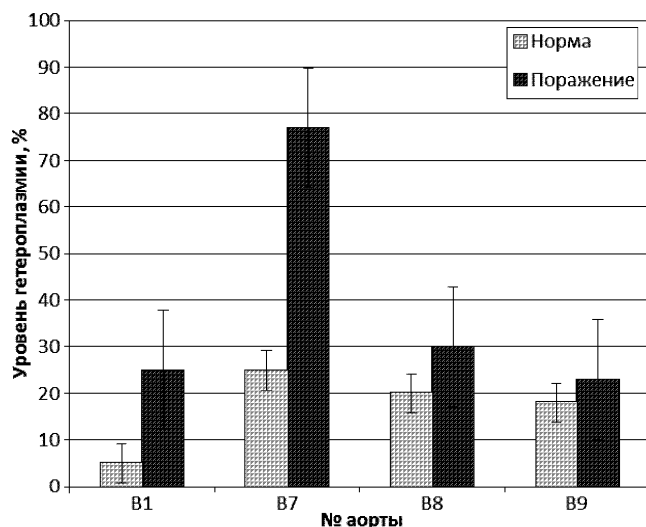


Рис. 1. Уровень гетероплазии мутации C5178A в гомогенатах интимы аорт

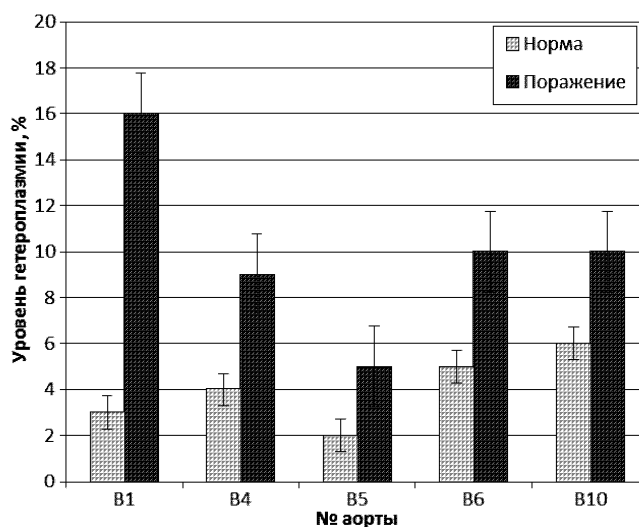


Рис. 2. Уровень гетероплазии мутации G14459A в гомогенатах интимы

Обнаружено 2 мутации, процент которых значительно выше в гомогенатах пораженной интимы аорты по сравнению с гомогенатами нормальной интимы. Это точечные мутации C5178A и G14459A (рис. 1 и 2). Согласно данным, представленным на гистограммах, можно видеть, что по мутации G14459A во всех гомогенатах и по мутации C5178A в гомогенатах аорт B1 и B7 различия между пораженной атеросклерозом и нормальной интимой достоверно значимы. Обращают на себя внимание компаундные митохондриальные мутации в гомогенате аорты B1, процент которых в несколько раз выше в гомогенате атеросклеротического поражения, чем в нормальной интиме. В аорте B7 отмечена трехкратная разница процента гетероплазии C5178A между нормальной и пораженной гладкомышечной сосудистой тканью.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что, по крайней мере, две соматические митохондриальные мутации: C5178A (ген субъединицы 2 NADH дегидрогеназы) и G14459A (ген субъединицы 6 NADH дегидрогеназы) ассоциированы с атеросклерозом. Это подтверждает полигенную гипотезу возникновения и развития мультифакториальных заболеваний, которая предполагает, что данные патологии являются следствием накопления мутаций.

Данная статья может быть полезна практикующим врачам, медицинским генетикам и исследователями в области изучения проблем атеросклероза.

*Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.*

### Список литературы

1. Желанкин А.В., Сазонова М.А. Роль мутаций митохондриального генома человека в развитии сахарного диабета 2 типа, артериальной гипертензии и различных видов кардиомиопатии // Проблемы и перспективы современной науки. — 2011. — Т. 3, №1. — С. 85–87.
2. Иванова М.М., Сазонова М.А., Желанкин А.В. и др. Мутации митохондриального генома в патологии человека // Фундаментальные науки и практика. — 2010. — Т. 1, №4. — С. 164–167.
3. Игамбердиев А.У. Уникальная генетическая система митохондрий // Соросовский образовательный журнал. — 2000. — Т. 6, №1. — С. 34.
4. Митрофанов К.Ю., Сазонова М.А. Связь мутаций митохондриального генома человека с клиническими проявлениями ишемической болезни сердца // Проблемы и перспективы современной науки. — 2011. — Т. 3, №1. — С. 92–96.
5. Сазонова М.А., Иванова М.М., Желанкин А.В. и др. Прямая количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома // Фундаментальные науки и практика. — 2010. — Т. 1, №2. — С. 19–21.
6. Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Собенин И.А., Орехов А.Н. Патентная заявка «Способ количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома в лейкоцитах крови человека». Входящий №065647, регистрационный №2009146012, от 14.12.2009.
7. Собенин И.А., Сазонова М.А., Постнов А.Ю. и др. Патентная заявка от 11.10.2010 «Способ генодиагностики сердечно-сосудистых заболеваний», регистрационный №2010141594.
8. Собенин И.А., Мясоедова В.А., Сазонова М.А. и др. Разработка метода комплексной оценки риска развития сердечно-сосудистых заболеваний и их осложнений на основе анализа генотипа и фенотипа // Сборник тезисов. Итоговая конференция по результатам выполнения мероприятия за 2009 год в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы». — М., 25–27 ноября 2009. — С. 134–135.

9. **Собенин И.А., Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н.** Патентная заявка от 10.08.2010 «Способ генетической диагностики предрасположенности к атеросклерозу», регистрационный №2010133468.

10. **Chol M., Lebon S., Benit P.** et al. The mitochondrial DNA G13513A MELAS mutation in the NADH dehydrogenase 5 gene is a frequent cause of Leigh-like syndrome with isolated complex I deficiency // *J. Med. Genet.* — 2003. — Vol. 40. — P. 188—191.

11. **Gropman A., Chen T.-J., Perng Ch.-L.** et al. Variable clinical manifestation of homoplasmic G14459A mitochondrial DNA mutation // *American Journal of Medical Genetics.* — 2004. — Vol. 124A. — P. 377—382.

12. <http://simgene.com/Primer3>

13. **Matsunaga H., Tanaka Y., Tanaka M.** et al. Antiatherogenic mitochondrial genotype in patients with type 2 diabetes // *Diabetes Care.* — 2001. — Vol. 24. — March. — P. 500—503.

14. **Sazonova M.A., Budnikov Y.Y., Khazanova Z.B.** et al. Direct quantitative assessment of mutant allele in mitochondrial genome in atherosclerotic lesion of human aorta. 76<sup>th</sup> Congress of the European Atherosclerosis Society, Helsinki, Finland, June 10—13, 2007 // *Atherosclerosis Suppl.* — 2007. — Vol. 8, №1. — P. 45—46.

15. **Sazonova M.A., Budnikov Y.Y., Khazanova Z.B.** et al. Studies of the human aortic intima by a direct quantitative assay of mutant alleles in the mitochondrial genome // *Atherosclerosis.* — 2009. — Vol. 204, №1. — P. 184—190.

16. **Solano A., Roig M., Vives-Bauza C.** et al. Bilateral Striatal Necrosis Associated with a Novel Mutation in the Mitochondrial ND6 Gene // *Ann. Neurol.* — 2003. — Vol. 54. — P. 527—530.

Поступила 24.10.12

#### Сведения об авторах:

**Синёв Василий Владимирович**, аспирант, лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН, НИИ атеросклероза

**Чичёва Мария Михайловна**, аспирант лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН, НИИ атеросклероза

**Митрофанов Константин Юрьевич**, аспирант, лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН, НИИ атеросклероза

**Желанкин Андрей Викторович**, аспирант лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН, НИИ атеросклероза

**Орехов Александр Николаевич**, д-р биол. наук, зав. лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН, НИИ атеросклероза

**Собенин Игорь Александрович**, д-р мед. наук, ФГБУ «НИИОПП» РАМН, ФГБУ «РКНПЦ» Минздрава РФ, НИИ атеросклероза

А.П. Пуговкин<sup>2</sup>, Н.А. Верлов<sup>1</sup>, В.О. Еркудов<sup>2</sup>, С.Б. Ланда<sup>1</sup>, В.В. Попов<sup>2</sup>,  
Н.Ф. Прийма<sup>2</sup>, М.А. Лебедева<sup>3</sup>, Н.Б. Панкова<sup>3</sup>, М.Я. Эйгель<sup>4</sup>

## **Неинвазивная оценка показателей системной гемодинамики по результатам исследования периферических сосудов**

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Санкт-Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова», 188300, Ленинградская обл., Гатчина, Орлова Роща.

<sup>2</sup> Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д.2

<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> Медицинский информационно-аналитический центр РАМН, 105066, Москва, ул. Нижняя Красносельская, 15

*В работе проводится анализ гемодинамических показателей здоровых испытуемых двух возрастных групп. Сравнение значений системного артериального давления и ударного объема левого желудочка, рассчитанных по способу Тейхольца на основании измерений эхокардиограммы, и восстановленных с помощью передаточных функций на базе зарегистрированных неинвазивно методом артериоритмографии пульсовых кривых, не выявили достоверных отличий. Обнаружены возрастные различия значений объемной скорости кровотока. Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения метода артериоритмографии для оценки гемодинамических показателей сердечно-сосудистой системы человека в условиях нормы и патологии, принимая во внимание некоторые ограничения указанного способа.*

**Ключевые слова:** артериоритмография, ультразвуковая эхокардиография, обобщенная передаточная функция, обобщенный импеданс

A.P. Pugovkin<sup>2</sup>, N.A. Verlov<sup>1</sup>, V.O. Yerkudov<sup>2</sup>, S.B. Landa<sup>1</sup>, V.V. Popov<sup>2</sup>,  
N.F. Priima<sup>2</sup>, M.A. Lebedeva<sup>3</sup>, N.B. Pankova<sup>3</sup>, M.Y. Eygel<sup>4</sup>

## **Non-invasive assessment of systemic hemodynamics study of peripheral vessels**

<sup>1</sup> Saint-Petersburg Institute of nuclear physics B.P. Konstantinov, RAS, 188300, Leningrad region, the city of Gatchina, Orlova Roshcha

<sup>2</sup> St.-Petersburg State Pediatric Medical Academy, 194100, St. Petersburg, Litovskaya str., 2

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

<sup>4</sup> Medical information-analytical center RAMS, 105066, Moscow, Nizhnyaya Krasnoselskaya str., 15

*A comparative study of the systemic hemodynamics was carried out in two different age groups of healthy male humans. Cardiac stroke volume was measured on the basis of Teichholz ultrasound echocardiography and computer Fourier analysis of the pulse curve revealed using non-invasive arteriorhythmography method. The aortic blood flow values obtained from ultrasound measurements and reconstructed from volume-clump measurements via transfer functions revealed no significant differences. Age-dependent differences were found out between blood flow curves calculated for the elder and younger groups. The results suggest the possibility of arteriorhythmographic method for evaluation of hemodynamic parameters of the cardiovascular system in normal state and in pathology, taking into advantage some limitation of this approach.*

**Key words:** arteriorhythmography, ultrasound echocardiography, generalized transfer function, generalized impedance

Своевременное получение достоверной информации о динамике сердечного выброса у пациентов с сосудистой патологией и гемодинамическими расстройствами часто определяет тактику, продолжительность и эффективность лечения [12, 18]. При этом надежность и простота оценки данного показателя напрямую зависит от метода его определения и техническо-

го оснащения клиники. Наиболее точными являются прямые способы измерения [19], однако в силу инвазивности возможность их применения ограничивается специализированными кардиохирургическими отделениями. Традиционным неинвазивным методом измерения ударного объема левого желудочка является расчет по данным ультразвуковой доплеровской эхокардиографии [13, 14], который пригоден для скринингового контроля данного показателя, но только при наличии специальной дорогостоящей аппаратуры и подготовленного персонала.

**Для корреспонденции:** Пуговкин Андрей Петрович, д-р биол. наук, проф. каф. нормальной физиологии ГБОУ ВПО СПбГПМА Минздрава РФ. E-mail: aarpugovkin@mail.ru

Исходя из этого, задача поиска альтернативных методов оценки сердечного выброса, сочетающих в себе точность, простоту в использовании и минимальную инвазивность, остается актуальной. К числу таких методов относятся способы, основанные на использовании математических алгоритмов, связывающих параметры давления и потока крови в аорте с давлением и потоком крови в периферических сосудах [15, 16, 20]. Данные приемы базируются на представлении о соотношении указанных параметров как входного, так и выходного сигналов динамической системы. Связь между такими сигналами может быть выражена посредством математических преобразований при использовании передаточных функций.

В предыдущих исследованиях в острых опытах на лабораторных животных [1] нами была выведена обобщенная передаточная функция, позволяющая проводить количественную оценку ударного объема и системного артериального давления на основании гармонического анализа кривой давления, получаемой на периферических сосудах. В указанной работе была показана применимость обобщенной передаточной функции и обобщенного сосудистого импеданса для оценки системного артериального давления и минутного объема кровообращения у крыс. Полученные таким образом результаты открывают принципиальную возможность использования обобщенных передаточных функций в клинике. Реализация такой возможности требует адаптации разработанного на экспериментальной модели математического аппарата к специфическим особенностям сосудистой системы человека, включая вывод передаточной функции, соответствующей ее параметрам.

Целью исследования являлась апробация возможности использования неинвазивного метода артериографии [17] в качестве способа количественной оценки сердечного выброса и системного артериального давления на основании применения обобщенных передаточных функций, выведенных для сосудистого русла человека. Оценивали возможность использования в клинической практике данных об аортальном потоке, восстановленных с помощью математического аппарата обобщенной передаточной функции и обобщенного импеданса, в сопоставлении с данными полученными методом ультразвуковой эхокардиографии.

### Методика

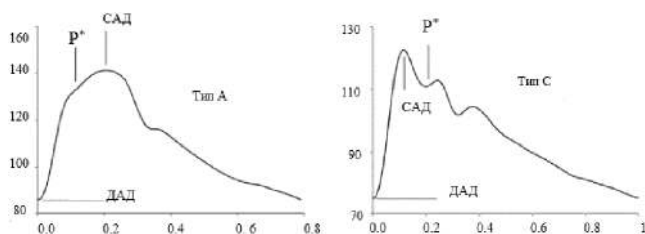
В исследовании приняли участие две группы добровольцев без наличия верифицированной патологии. Первую составили 14 здоровых мужчин в возрасте 18—23 лет (средний возраст 19,2 года), вторую — 31 мужчина старшего возраста от 30 до 82 лет (средний возраст 60,5 лет). Все испытуемые подписывали информированное согласие на участие в исследовании. Критерием включения в обследование являлось отсут-

ствии диагностированной патологии сердечно-сосудистой системы и артериальной гипертензии.

На первом этапе работы проводили анкетирование испытуемых, сбор антропометрических данных (рост и масса тела), и трехкратно измерялись показатели артериального давления аппаратом GE 100V2.

На втором этапе работы каждому испытуемому, находящемуся в комнате с постоянной температурой комфорта, с ограничением воздействия света и звука, в положении лежа проводили синхронную регистрацию М-модальной эхокардиограммы на аппарате марки Samsung SA 9900 с линейным датчиком в диапазоне выпускаемых частот 2—5 МГц. Для расчета величины ударного объема применялся метод Тейхольца [21]. Кроме того, у испытуемых производилась непрерывная регистрация артериального давления в течение 2 мин на среднем пальце правой руки по методу Пеназа [17] с помощью прибора спиреокардиограф (САКР) [4]. Данное устройство разрешено к применению Комитетом по новой медицинской технике Министерства здравоохранения РФ (регистрационное удостоверение №29/03020703/5869-04 от 29.01.04) и используется в качестве средства скринингового контроля за функциональным состоянием сердечно-сосудистой системы [2, 3, 5]. Метод Пеназа (метод «разгруженной артерии») основан на непрерывной оценке объема сосудов пальца фотоплетизмографическим способом и использовании следящей электропневматической системы для создания в окружающей палец манжете давления, противодействующего растяжению проходящих под манжетой артериальных сосудов.

Форма пульсовой кривой давления позволяет высказывать оценочные суждения об эластических свойствах артериального отдела сосудистой системы. Различают А- и С-типы пульсовых волн системного артериального давления [11]. Отличие форм кривых А-типа и С-типа определяется тем, как момент возврата отраженной пульсовой волны давления соотносится с моментом достижения максимума давления в систолу. Момент возврата отраженной волны давления определяется по точке перегиба пульсовой кривой давления. Если данная точка (рис. 1), находится на анакроте (участке систолического подъема), то это значит, что волна давления вернулась раньше, чем наступила систола, следовательно, можно говорить о высокой жесткости сосудистого русла. В случае низкой жесткости (или высокой эластичности) материала сосудистой стенки точка перегиба находится на участке кривой после систолы. К волнам А-типа относятся кривые волны пульсового давления, на которых точка перегиба находится на участке систолического роста давления (анакроте). Для волн С-типа точка перегиба находится на участке постсистолического спада давления (катакроте), но по времени предшествует появлению диастолической выемки. С целью выявления



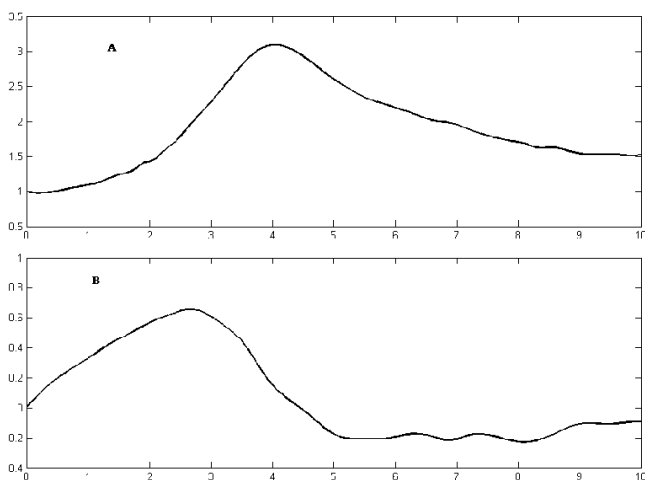
**Рис. 1.** Различие А-типа и С-типа волн артериального давления. По оси абсцисс — время (с); по оси ординат — артериальное давление (мм рт. ст.); САД — систолическое артериальное давление; ДАД — диастолическое артериальное давление; P\* — точка перегиба пульсовой кривой давления

возможных возрастных особенностей формы пульсовой кривой артериального давления из каждой группы испытуемых были сделаны выборки лиц моложе 20 и старше 60 лет (средний возраст 19 и 68 лет соответственно).

В качестве математического аппарата для статистического анализа полученных результатов был выбран однофакторный дисперсионный анализ ANOVA из программного пакета Statistica.

### Результаты и обсуждение

На основании полученных пульсовых кривых периферического артериального давления была рассчитана обобщенная передаточная функция на базе математической модели сосудистой системы с распределенными параметрами (рис. 2). Данная функция позволяет производить оценку системного артериального давления, основываясь на мгновенных значениях величины артериального давления в периферических сосудах.

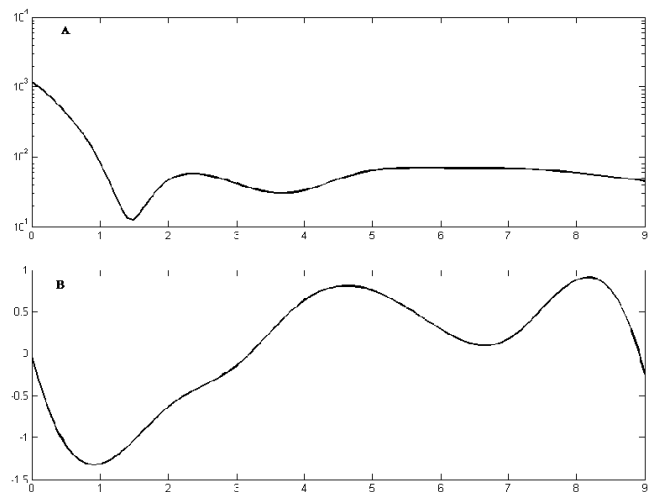


**Рис. 2.** Передаточная функция, связывающая артериальное давление в периферических сосудах и артериальное давление в аорте: А — по оси абсцисс — частота (Гц); по оси ординат — отношение амплитуд; В — по оси абсцисс — частота; по оси ординат — сдвиг фаз (рад)

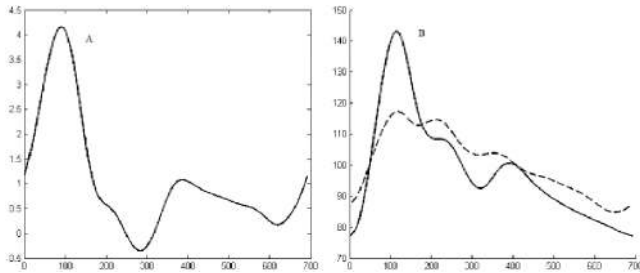
На основании этого расчета и результатов предыдущих исследований была вычислена еще одна передаточная функция (рис. 3), которая делает возможным переход от оценки величины артериального давления к значению сердечного выброса. Полученные таким образом величины ударного и минутного объемов левого желудочка сопоставлялись со значениями тех же показателей, рассчитанными по методу Тейхольца на основании измерений эхокардиограммы в М-режиме.

Среднее значение объемных скоростей потоков крови в аорте у испытуемых из старшей и младшей возрастных групп составляло: рассчитанными по методу Тейхольца на основании измерений эхокардиограммы —  $65,8 \pm 21,9$  и  $74,8 \pm 20$  мл соответственно, а полученных с помощью передаточной функции —  $70,8 \pm 16,8$  и  $77,4 \pm 37,8$  мл соответственно (рис. 4, 5). Статистический анализ показал, что величины объемного кровотока в аорте, усредненные для каждой группы испытуемых, при применении обоих методов не имеют достоверных различий (рис. 6).

Интересно отметить, что на восстановленных кривых давления у лиц моложе 20 лет и лиц старше 65 лет отчетливо заметно различие в типах формы волны восстановленного давления в аорте. Выборку из «младшей» группы составляли 10 чел. в возрасте от 18 до 21 года (средний возраст 19 лет), выборку из «старшей» группы составляли 8 человек, возраст которых варьировал от 61 до 82 лет (средний возраст 68 лет). В первой выборке лишь у двоих испытуемых имелся А-тип пульсовой кривой, тогда как во второй выборке все 8 испытуемых характеризуются А-типом пульсовой волны.



**Рис. 3.** Обобщенный импеданс для связи артериального давления и объемной скорости кровотока в аорте: А — по оси абсцисс — частота (Гц), по оси ординат — отношение амплитуд; В — по оси абсцисс — частота, по оси ординат — сдвиг фаз (рад)



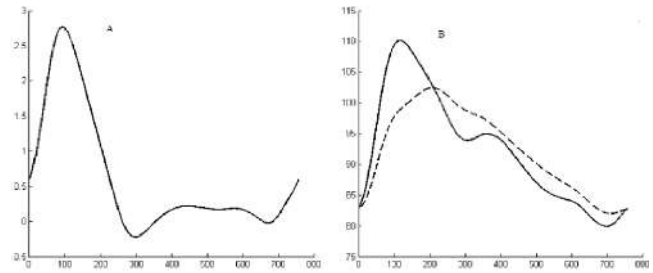
**Рис. 4.** Пример кривой артериального давления (В) и объемной скорости кровотока в аорте (А) «молодой» группы испытуемых: А — по оси абсцисс — время (мс); по оси ординат — объемная скорость кровотока, мл/мс; В — по оси абсцисс — время (мс); по оси ординат — артериальное давление, мм рт. ст. Сплошная линия — кривая артериального давления в сосудах пальцев, пунктирная линия — давление в аорте, восстановленное из давления в сосудах пальцев

Эти различия, по-видимому, отражают, характерные возрастные изменения жесткости сосудистой стенки. Абсолютное преобладание А-типа пульсовой волны свидетельствует о сравнительно высокой жесткости и низкой эластичности артериальных сосудов у лиц старшего возраста, тогда как артериальное русло у испытуемых среднего и младшего возраста характеризуется относительно низкой жесткостью и высокой эластичностью.

Таким образом, полученные результаты указывают на перспективность применяемой методики в отношении использования ее как средства динамической оценки значений системного артериального давления и сердечного выброса. После проведения популяционных скрининговых исследований на больших выборках, возможно внедрение обсуждаемых методов в практическом здравоохранении, например, в условиях реанимационного отделения.

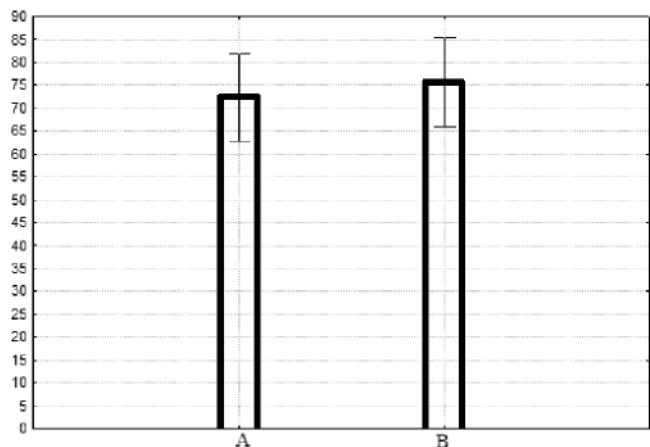
В клинике уже используются дорогостоящие импортные аналоги спиртоартериокардиографов — Sphygmocor, FloTrac-Vigileo™, Finometer, в которых описанные выше процедуры пересчета входят в пакет программного обеспечения. Данные устройства применяются, например, для оценки сердечного выброса обсуждаемым методом у здоровых молодых людей при различных состояниях [6] и воздействии фармакологических препаратов [9, 20]. В настоящей работе демонстрируется возможность замены указанных устройств сертифицированным малобюджетным отечественным аналогом, стоимость которого является безусловным преимуществом для выполнения поставленных задач.

Однако использованный в настоящем работе метод в силу наличия ряда ограничений не может претендовать на применение в абсолютно всех клинических ситуациях, когда необходимо оценить величину объемной скорости системного кровотока. Во-первых, он имеет большую, по сравнению с инвазивными методами, техническую и вычислительную погрешность, а поэтому



**Рис. 5.** Пример кривой артериального давления и объемной скорости кровотока «старшей» группы испытуемых: А — по оси абсцисс — время (мс); по оси ординат — объемная скорость кровотока, мл/мс; В — по оси абсцисс — время (мс); по оси ординат — артериальное давление, мм рт. ст. Сплошная линия — кривая артериального давления в сосудах пальцев, пунктирная линия — давление в аорте, восстановленное из давления в сосудах пальцев.

не может заменять прямые методы оценки [19]. Во-вторых, для надежного использования характеристик периодических процессов в периферических сосудах с целью вычисления параметров системной гемодинамики необходима относительная стабильность основных параметров системной гемодинамики [10]. Рассчитанные таким образом показатели ударного объема и системного артериального давления существенно меняются в случае значительной кровопотери [8] или сужения сосудов [7]. Оценка изменений передаточной функции в условиях переходных процессов в сердечно-сосудистой системе в будущем должна составить предмет самостоятельного исследования.



**Рис. 6.** Сравнение величин объемной скорости потока крови в аорте, рассчитанных по методу Тейхольца на основании измерений М-модальной эхокардиограммы (А) и восстановленных с использованием передаточной функции (В) для обеих групп испытуемых. По оси ординат — объемная скорость потока крови в аорте, мл/с.  $P=0,63$  позволяют говорить об отсутствии достоверности в различиях величин объемной скорости кровотока в аорте, рассчитанных по методу Тейхольца на основании измерений М-модальной эхокардиограммы и рассчитанных с применением передаточных функций.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007—2013 гг.» и госконтракта №07.514.11.4124 на выполнение научно-исследовательских работ от 31.05.12.

### Список литературы

1. **Балуева Т.В., Верлов Н.А., Еркудов В.О.** и др. Оценка параметров систолической гемодинамики по данным исследования периферических сосудов // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2011. — Т. 38, №2. — С. 79—84.
2. **Панкова Н.Б., Надоров С.А., Карганов М.Ю.** Анализ вариабельности сердечного ритма и артериального давления при разных функциональных пробах у женщин и мужчин // Физиология человека. — 2008. — Т. 34, №4. — С. 64—72.
3. **Панкова Н.Б., Хлебникова Н.Н., Виравова А.Р.** и др. Реакция сердечно-сосудистой системы у первоклассников в начале школьного обучения // Российский педиатрический журнал. — 2006. — №6. — С. 33—38.
4. **Пивоваров В.В.** Спироартериокардиоритмограф // Медицинская техника. — 2006. — №1. — С. 38—42.
5. **Пивоваров В.В., Лебедева М.А., Панкова Н.Б.** и др. Диагностика функционального состояния сердечно-сосудистой системы детского организма методом спироартериокардиоритмографии // Российский педиатрический журнал. — 2005. — №1. — С. 8—12.
6. **Antonutto G., Girardis M., Tuniz D., di Prampero P.E.** Noninvasive assessment of cardiac output from arterial pressure profiles during exercise // Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol. — 1995. — Vol. 72, №1—2. — P. 18—24.
7. **Biancofiore G., Critchley L.A., Lee A.** et al. Evaluation of an uncalibrated arterial pulse contour cardiac output monitoring system in cirrhotic patients undergoing liver surgery // Br. J. Anaesth. — 2009. — Vol. 102, №1. — P. 47—54.
8. **Bein B., Meybohm P., Cavus E.** et al. The reliability of pulse contour-derived cardiac output during hemorrhage and after vasopressor administration // Anesth. Analg. — 2007. — Vol. 105, №1. — P. 107—113.
9. **Cockburn J.A., Brett S.E., Guilcher A.** et al. Differential effects of beta-adrenoreceptor antagonists on central and peripheral blood pressure at rest and during exercise // Br. J. Clin. Pharmacol. — 2010. — Vol. 69, №4. — P. 329—335.
10. **Critchley L.A.** Self-calibrating pulse contour cardiac output: do validation studies really show its clinical reliability? // Crit. Care. — 2009. — Vol. 13, №2. — R.32.
11. **Dieter R.S.** et al. Flow dynamics and arterial physiology // Peripheral Arterial Disease. The McGraw-Hill Companies. — 2009. — P. 93—113.
12. **Eingensberg P.K., Jaffe A.S., Schuster D.P.** Clinical evaluation compared to pulmonary artery catheterization in the hemodynamic assessment of critically ill patients // Crit. Care Med. — 1984. — Vol. 12, №7. — P. 549—553.
13. **Hoskins P.R.** Measurement of arterial blood flow by Doppler ultrasound // Clin. Phys. Physiol. Meas. — 1990. — Vol. 11, №1. — P. 1—26.
14. **Hudson I., Houston A., Aitchison T.** et al. Reproducibility of measurements of cardiac output in newborn infants by Doppler ultrasound // Arch. Dis. Child. — 1990. — Vol. 65. — 1 Spec. No. — P. 15—19.
15. **Millasseau S.C., Guigui F.G., Kelly R.P.** et al. Noninvasive assessment of the digital volume pulse. Comparison with the peripheral pressure pulse // Hypertension. — 2000. — Vol. 36, №6. — P. 952—956.
16. **Pauca A.L., O'Rourke M.F., Kon N.D.** Prospective evaluation of a method for estimating ascending aortic pressure from the radial artery pressure waveform // Hypertension. — 2001. — №4(38). — P. 932—937.
17. **Penaz J.** Photoelectric measurement of blood pressure, volume and flow in the finger // Digest of the International Conference on Medicine and Biological Engineering. — Dresden, 1973. — P. 104.
18. **Pinsky M.R.** Why measure cardiac output? // Crit. Care. — 2003. — Vol. 7, №2. — P. 114—116.
19. **Stover J.F., Stocker R., Lenherr R.** Noninvasive cardiac output and blood pressure monitoring cannot replace an invasive monitoring system in critically ill patients // BMC Anesthesiology. — 2009. — 9:6.
20. **Tahvanainen A., Leskinen M., Koskela J.** Non-invasive measurement of the haemodynamic effects of inhaled salbutamol, intravenous L-arginine and sublingual nitroglycerin // Br. J. Clin. Pharmacol. — 2009. — Vol. 68, №1. — P. 23—33.
21. **Teichholz L.E., Kreulen T., Herman M.V., Gorlin R.** Problems in echocardiographic volume determinations: echocardiographic-angiographic correlations in the presence or absence of asynergy // Am. J. Cardiol. — 1976. — Vol. 37, №1. — P. 7—11.

Поступила 01.11.12

### Сведения об авторах:

**Верлов Николай Александрович**, мл. науч. сотр. отд. молекулярной и радиационной биофизики ФГБУ «ПИАФ»  
**Еркудов Валерий Олегович**, ассистент кафедры нормальной физиологии ГБОУ ВПО СПбГПМА Минздрава РФ  
**Ланда Сергей Борисович**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отд. молекулярной и радиационной биофизики ФГБУ «ПИАФ»  
**Попов Валерий Витальевич**, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. новых медицинских технологий НИЦ ГБОУ ВПО СПбГПМА Минздрава РФ  
**Прийма Николай Федорович**, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., зав. лаб. новых медицинских технологий НИЦ ГБОУ ВПО СПбГПМА Минздрава РФ  
**Лебедева Марина Андреевна**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. полисистемных исследований ФГБУ «НИИ ОПП» РАМН  
**Панкова Наталья Борисовна**, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. полисистемных исследований ФГБУ «НИИ ОПП» РАМН  
**Эйгель Максим Янович**, зам. директора МИАЦ РАМН

А.С. Роткина, Е.П. Романова, А.А. Московцев, А.А. Кубатиев

## **Динамика изменений АДФ- и тромбин-индуцированной агрегационной активности тромбоцитов в присутствии избытка гомоцистеина *in vitro***

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

Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) — повышение уровня общего гомоцистеина (ГЦ) в плазме крови выше 12 мкМ — ассоциирована с дисфункцией эндотелия, изменением плазменных факторов свертывания крови и повышением агрегации тромбоцитов [7, 18]. Несмотря на растущее число исследований, механизмы, приводящие к изменениям агрегационной активности тромбоцитов в присутствии ГЦ изучены недостаточно. Данное экспериментальное исследование выполнено на богатой тромбоцитами плазме кролика (PRP) и суспензиях отмывтых тромбоцитов кролика и человека (WP). Были проведены инкубации различной продолжительности тромбоцитов с повышенными концентрациями ГЦ, а также ГЦ в комбинации с блокатором сульфгидрильных групп *N*-этилмалеимидом (NEM). Установлено, что ГЦ оказывает прямое влияние на агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ и тромбином. Данное влияние носит время- и дозозависимый характер. Обнаружены различия эффектов ГЦ в PRP и WP. NEM оказывал дозозависимое ингибирующее действие на агрегацию тромбоцитов, преинкубация с NEM полностью снимала стимулирующий эффект ГЦ на агрегацию. Эффекты гомоцистеина могут быть опосредованы его участием в реакциях тиол-дисульфидного обмена с тиолами плазмы и поверхностными белками тромбоцитов. Характер временных изменений агрегационной активности в присутствии ГЦ позволяет предположить многофакторность его влияния на тромбоциты.

**Ключевые слова:** гомоцистеин, тромбоциты, агрегация, АДФ, тромбин

A.S. Rotkina, E.P. Romanova, A.A. Moskvotsev, A.A. Kybatiev

## **Dynamics of changes of ADP-, thrombin-induced platelet aggregation activity in the presence of an excess of homocysteine *in vitro***

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

Recent evidence indicates that hyperhomocysteinemia (HHc) leads to endothelial dysfunction, changes in plasma factors and increased platelet aggregation [7, 18]. However, the mechanisms of platelet aggregation alterations in the presence of homocysteine (Hcy) are established not. This study was performed in platelet rich plasma (PRP) and platelet suspension, incubated in the presence of Hcy (10, 50, 100 μM) for 120 minutes and in combination Hcy with NEM. Results indicate that Hcy has a direct effect on platelet aggregation induced by ADP and thrombin. This effect has a time and dose dependent character. NEM has a dose-dependent inhibitory effect on platelet aggregation and pre-incubation with NEM eliminates the stimulating effect on the aggregation of Hcy completely. The effects of Hcy may be mediated by its participation in the reactions of thiol-disulfide exchange with thiols of plasma and platelet surface proteins. The specificity of the time dependence proves multifactor effect of Hcy on platelet activity.

**Key words:** homocysteine, platelets, aggregation, ADP, thrombin

Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) — повышение уровня гомоцистеина (ГЦ) в плазме крови выше 12 мкМ — является независимым фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний [3]. ГГЦ ассоциирована с рядом заболеваний, таких, как болезнь Альцгеймера, шизофрения, заболевания почек, остеопороз, инсулиннезависимый диабет [6]. В ряде исследований показано, что ГГЦ

приводит к дисфункции эндотелия, изменению плазменных факторов свертывания крови и повышению агрегации тромбоцитов [7, 18].

Предложено несколько возможных механизмов нарушений функций тромбоцитов при ГГЦ [13] и могущих приводить к активации агрегационной активности:

- инициируемый аутоокислением ГЦ окислительный стресс [4], вызывающий повреждение клеточных мембран и повышение уровня окисленных липопротеинов низкой плотности [9, 22];

Для корреспонденции: Роткина Анна Сергеевна, научн. сотр. лаб. молекулярных механизмов тромбогенеза и тромболитизиса ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: annanum@mail.ru



- повышение GPIIb-IIIa/фибриногензависимой адгезии тромбоцитов к эндотелию [8];
- ингибирование образования оксида азота в тромбоцитах [17];
- возрастание чувствительности тромбоцитов к агонистам при параллельном снижении чувствительности к агентам, ингибирующим агрегацию [20];
- ингибирование гидролиза внеклеточной АТФ и АДФ [25] и некоторые другие.

При анализе изменений агрегации тромбоцитов под влиянием Гц *in vitro* большинством исследователей было установлено повышение агрегации, индуцированной тромбином и АДФ [19, 24], однако существуют работы, не подтверждающие эти данные [27]. По нашему мнению, выявление временной зависимости воздействия Гц на агрегацию тромбоцитов может быть полезным при определении характера механизма активации тромбоцитов в присутствии Гц. Применение блокатора сульфидрильных групп N-этилмалеимида (NEM) позволяет оценить вклад реакций тиол-дисульфидного обмена в молекулярные механизмы модулирования гомоцистеином функционального состояния тромбоцитов.

### Методика

Эксперименты проведены на 10 кроликах-самцах Шиншилла, массой 3—3,5 кг. Здоровые животные содержались в стандартных условиях вивария. Взятие крови производили из краевой ушной вены методом свободного истечения.

Кровь для получения тромбоцитов человека получали от регулярных доноров Гематологического научного центра РАМН. Образцы транспортировались при 37°C в лабораторию, где осуществлялась пробоподготовка. Для получения богатой тромбоцитами плазмы (PRP) кровь брали в пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта 3,8%-ный раствор цитрата натрия в соотношении 9:1; для работы с суспензией тромбоцитов — кислый цитратный буфер (ACD): лимонная кислота 85 мМ, трехзамещенный цитрат натрия 66 мМ, глюкоза 111 мМ в соотношении 6:1.

#### Получение богатой тромбоцитами плазмы

Кровь центрифугировали (Jouan BR4i multifunction Centrifuge, Франция) 10 мин 70 г при 23°C. Затем производили отбор PRP, а оставшийся осадок центрифугировали для получения бедной тромбоцитами плазмы (PPP) в течение 15 мин при 780 г.

#### Получение суспензии тромбоцитов (WP) кролика

Для осаждения тромбоцитов PRP центрифугировали 2 мин при 340 г. Супернатант сливали, тщательно просушивали пробирки и небольшими порциями добавляли, размешивая мягким постукиванием тром-

боцитарный осадок, буфер Тироде (рН 7,35: 136, 89 мМ NaCl, 2,68 мМ KCl, 1,8 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,36 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11,9 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 5,5 мМ glucose, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,02% апураза (Sigma)), в объеме равном объему PRP.

#### Получение WP человека

Суспензию тромбоцитов человека получали путём гельфильтрации с использованием сефарозы (Sephagosa 2B, Sigma).

Подсчет общего количества тромбоцитов проводили в камере Горяева по стандартной методике с использованием светового микроскопа СЕТ1 0406025. Количество тромбоцитов в рабочем образце доводили бедной тромбоцитами плазмой (при работе с PRP) или буфером Тироде (при работе с суспензией) до  $(180-200) \times 10^9$ /л. Рабочий раствор гомоцистеина (D,L-homocysteine, Sigma) 50 ммоль/л готовили из сухого вещества. Пробы инкубировали при комнатной температуре с конечными концентрациями гомоцистеина — 10, 50, 100 мкМ. Начиная с 5 мин инкубации, во временные интервалы 15-30 мин отбирали из опытной и контрольной пробирки аликвоты и оценивали функциональное состояние тромбоцитов по их агрегации в PRP и в суспензии тромбоцитов с использованием следующих индукторов агрегации: АДФ (Chrono-Log) в конечной концентрации от 0,625-1,25 мкМ и тромбина (Chrono-Log) в конечной концентрации 0,025 Ед/мл. Концентрация АДФ была подобрана таким образом, чтобы в контрольной пробе в начале эксперимента агрегационная активность тромбоцитов составляла 20-25%. Функциональная активность тромбоцитов оценивалась фотометрически с помощью двухканального агрегометра (Chrono-Log 700).

Определение содержания свободного гомоцистеина в плазме крови проводили с использованием методики высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии. Уровень свободного гомоцистеина в плазме крови кролика составил от 3 до 5 мкМ [2]

Анализ экспрессии Р-селектина проводили с использованием моноклональных антител Абсам (США), меченых фикоэритрином, методом проточной цитометрии (FACSCalibur BD, США).

Статистическая обработка результатов проводилась по методу Стьюдента для связанных наблюдений. В качестве нуль-гипотезы была принята гипотеза, что средние значения уровня агрегации в опыте и контроле совпадают. Альтернативой служила гипотеза, что средний уровень агрегации в опыте выше, чем в контроле (если эмпирическое среднее положительно) или средний уровень агрегации в опыте ниже, чем в контроле (если эмпирическое среднее отрицательно). Достоверными считались различия показателей при  $p < 0,05$ .

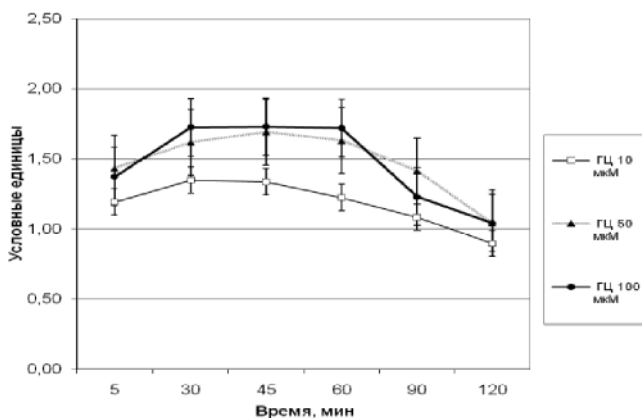


Рис. 1. Среднее изменение агрегации тромбоцитов кролика относительно контроля при инкубации тромбоцитов в богатой плазме с Гц (10, 50, 100 мкМ) относительно контроля, индуктор АДФ (0,625–1,25 мкМ)

## Результаты и обсуждение

### Влияние Гц на АДФ-индуцированную агрегацию в богатой тромбоцитами плазме кролика

Как видно из рис. 1, Гц в концентрациях 10, 50, 100 мкМ уже к 5-й минуте инкубации вызывает статистически значимое повышение агрегации тромбоцитов кролика относительно контроля ( $p < 0,05$ ). В последующие сроки инкубации в опытных образцах агрегация возрастала, достигая максимального значения к 30-й — 60-й минуте. К 90-й — 120-й мин агрегация в опытных пробах снижалась до контрольных значений. Гц в концентрациях 50 и 100 мкМ вызывает практически одинаковое усиление агрегации, тогда как рост агрегации под действием Гц 10 мкМ был существенно ниже ( $p < 0,05$ ). Таким образом, выражен прямой дозозависимый эффект между концентрациями Гц 10 и 50 мкМ и Гц 10 и 100 мкМ.

### Влияние Гц на АДФ-индуцированную (0,625–1,25 мкМ) агрегацию в суспензии тромбоцитов кролика и человека

Агрегационная активность тромбоцитов кролика (рис. 2) в суспензии в присутствии Гц (10 мкМ и 50 мкМ) к 5-й минуте инкубации в большинстве опытных образцов была существенно выше, чем в контроле, а под действием Гц 100 мкМ наблюдалось снижение агрегации. В дальнейшие сроки наблюдения агрегация снижалась во всех опытных образцах, достигая минимума к 120-й минуте при концентрациях Гц 10 мкМ, 50 мкМ, а при концентрации Гц 100 мкМ к 60-й минуте чувствительность тромбоцитов к АДФ (1,25 мкМ) отсутствовала. Достоверное снижение агрегации наблюдалось к 30-й, 45-й, 60-й минуте при концентрациях Гц 10, 50, 100 мкМ соответственно.

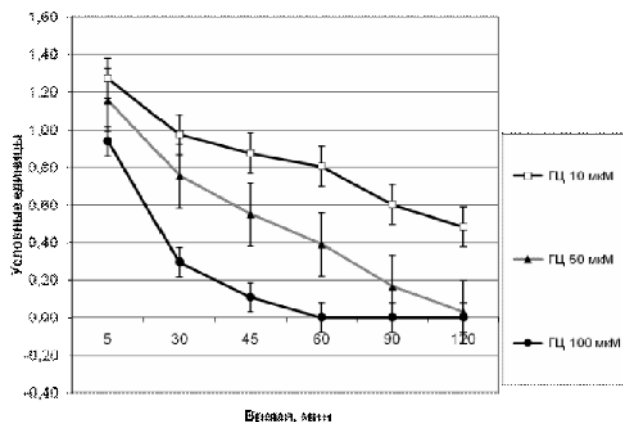


Рис. 2. Среднее изменение агрегации в суспензии тромбоцитов кролика при инкубации с Гц (10, 50, 100 мкМ) относительно контроля, индуктор АДФ (0,625–1,25 мкМ)

Агрегационная активность тромбоцитов человека (рис. 3) на 5-й минуте инкубации с Гц в концентрации 10 мкМ и 50 мкМ была незначительно выше контроля, при 100 мкМ Гц наблюдалось, как и для тромбоцитов кролика, снижение агрегации. В более поздних временных точках агрегационная активность тромбоцитов человека снижалась сходным образом, отсутствие чувствительности к АДФ имело место на 45-й минуте для концентрации 100 мкМ. Тромбоциты человека, инкубированные с Гц в концентрации 10 мкМ, 50 мкМ, сохраняли, в отличие от кроличьих, низкую чувствительность к АДФ на 120-й минуте (рис. 3). Таким образом, Гц оказывает обратный дозозависимый эффект на величину и прямой дозозависимый на скорость снижения агрегации отмытых тромбоцитов кролика.

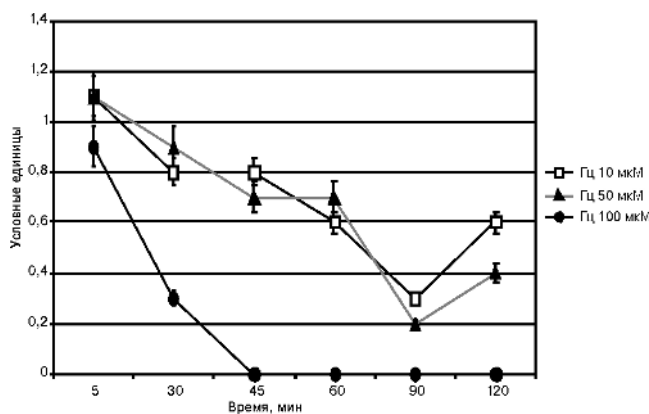
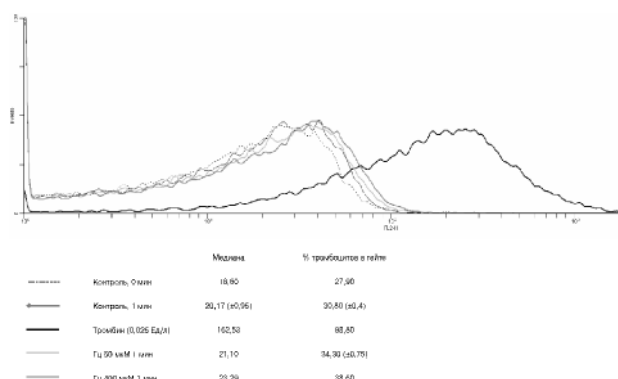
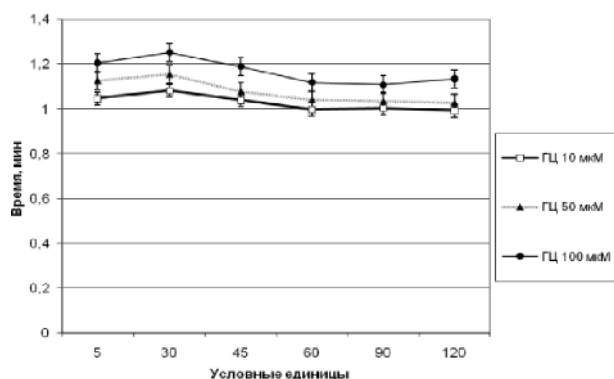


Рис. 3. Среднее изменение агрегации в суспензии тромбоцитов человека при инкубации с Гц (10, 50, 100 мкМ) относительно контроля, индуктор АДФ (0,625–1,25 мкМ)



*Влияние Гц на агрегацию, индуцированную тромбином в суспензии тромбоцитов кролика*

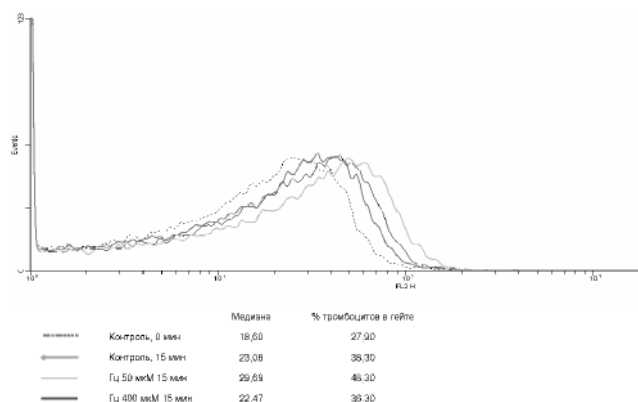
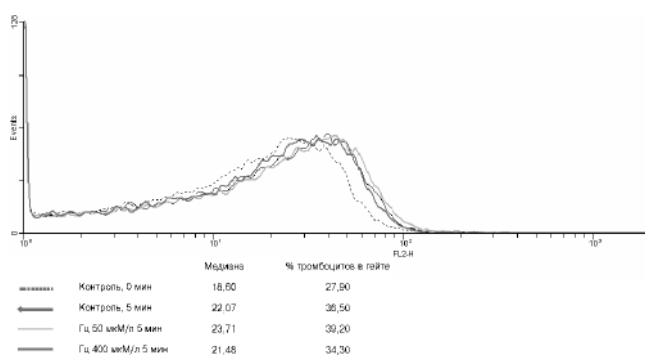
На 5-й минуте инкубации (рис. 4) с Гц 10 мкМ тромбин-индуцированная агрегация тромбоцитов имела незначительную тенденцию к повышению, а при Гц 50 мкМ, 100 мкМ — была достоверно выше относительно контроля ( $p < 0,05$ ). При этом повышение агрегационной активности носило прямой дозозависимый характер. Максимум повышения агрегации достигался к 30-й минуте и в последующие сроки инкубации наблюдалось снижение: при Гц 10 мкМ и 50 мкМ приближалось к контрольным значениям, а при Гц 100 мкМ — оставалось выше контроля.

*Влияние избытка гомоцистеина на экспрессию P-селектина тромбоцитами человека in vitro*

Для оценки функционального состояния тромбоцитов человека, инкубированных с Гц, мы провели

исследование экспрессии ими P-селектина. Избыток Гц приводил к сравнительно слабой экспрессии P-селектина на поверхности тромбоцитов, которая имела незначительную тенденцию к повышению при увеличении концентрации Гц (с 50 мкМ до 400 мкМ) и времени инкубации от 1 до 15 мин (рис. 5—7). Для концентрации Гц 400 мкМ смещение пика флуоресценции отмечалось только для кратковременной инкубации 1 мин, для временных точек в 5 и 15 мин отличий от контроля не наблюдалось. Для меньших концентраций Гц 50 мкМ и 100 мкМ регистрировали сравнительно небольшой рост интенсивности флуоресценции с увеличением времени инкубации, т.е. имела место зависимость экспрессии P-селектина от времени инкубации.

Полученные данные по экспрессии P-селектина тромбоцитами человека, инкубированных с Гц, позволяют утверждать, что Гц в концентрации 50 и 100 мкМ приводит к незначительному росту экспрессии P-селектина, зависящему от времени инкубации.



По-видимому, Гц не приводит к существенной деградации тромбоцитов. В связи с этим интересно отметить, что более сильный восстановитель дитиотрейтол способен в отсутствие индукторов вызывать медленную обратимую агрегацию тромбоцитов [3].

*Влияние NEM, NEM в сочетании с Гц на АДФ-индуцированную агрегацию в суспензии тромбоцитов кролика и человека*

Проведенные исследования показали, что влияние N-этилмалеимида на агрегационную активность тромбоцитов в суспензии носит ингибирующий дозозависимый характер. При использовании концентрации индуктора агрегации АДФ 1,25 мкМ, обеспечивавшей ~30% агрегацию в контроле, 50% ингибирование достигалось для концентраций NEM в диапазоне 10—15 мкМ для тромбоцитов кролика (рис. 8) и 5—10 мкМ для тромбоцитов человека (рис. 9) в интервалы инкубации в пределах 15 мин. Достоверной зависимости снижения агрегационной активности тромбоцитов от времени инкубации с NEM нами не было зафиксировано. Предварительная инкубация с NEM полностью устраняет эффект увеличения агрегационной активности, индуцируемый гомоцистеином. В результате предварительной инкубации тромбоцитов с NEM и последующей с Гц агрегационная активность снижалась более, чем при инкубации только с NEM.

### Обсуждение

Гц принадлежит к ряду биологически значимых низкомолекулярных тиолов. Оценки значения рKa сульфгидрильной группы гомоцистеина находятся в диапазоне 8,7—10, и чуть менее 1% молекул гомоцистеина при физиологическом рН находится в форме тиолат-аниона. Основная форма гомоцистеина в плазме крови — смешанные дисульфиды с белками

плазмы — составляет около 70% общего гомоцистеина. Альбумин, содержащий 35 цистеиновых остатков, 34 из которых представляют собой дисульфидные межцепочечные связи, предполагается основным переносчиком тиолов в циркуляции, при этом для переноса цистеина или глутатиона в виде дисульфидов задействуется единственный свободный цистеин в N-концевой части альбумина в позиции 34 [6]. При метиониновой и гомоцистеиновой нагрузках у здоровых добровольцев, белок-связанный цистеин замещался гомоцистеином [6]. Считается, что в этом случае имеет место реакция тиол-дисульфидного обмена, в процессе которого тиолат-анион гомоцистеина атакует белок-связанный цистеин с формированием смешанного дисульфида гомоцистеин-альбумин и высвобождением тиолат-аниона цистеина. Так как тиолат-анион гомоцистеина обладает большей нуклеофильностью, равновесие реакции сдвинуто в сторону образования белок-связанного гомоцистеина. Эта модель соответствует ситуации в физиологических условиях, где в циркуляции большая часть гомоцистеина находится в связанном с белком виде на фоне относительно высокой концентрации свободного восстановленного цистеина.

Растущее количество исследований указывает на важную роль тиоловых групп и дисульфидных связей в сложном динамическом процессе, регулирующем функции белков и клетки в целом. В процессе активации тромбоцитов ряд дисульфидных связей поверхностных белков восстанавливается в сульфгидрильные группы [5, 10]. Предположено, что процесс модификации сульфгидрильных групп и дисульфидных связей может активно модулироваться тромбоцитами — плазматическая мембрана тромбоцитов содержит элементы электронотранспортной цепи, способной восстанавливать дисульфидные связи [11, 12]. В ряде недавних работ на поверхности тромбоцитов были обнаружены не только белки из семейства протеиндису-

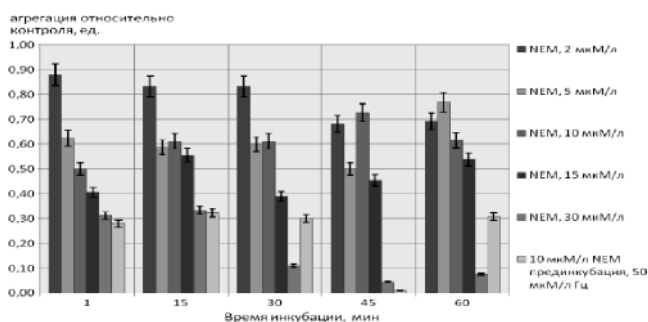


Рис. 8. АДФ-индуцированная (АДФ 1,25 мкМ) агрегация при инкубации разной продолжительности суспензии тромбоцитов кролика с различными концентрациями N-этилмалеимида NEM, а также прединкубации с NEM и последующей инкубацией с гомоцистеином

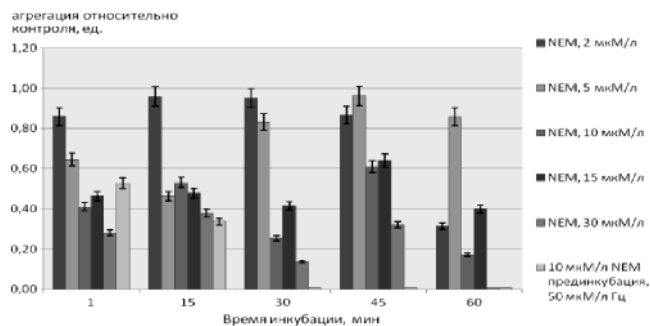


Рис. 9. АДФ-индуцированная (АДФ 1,25 мкМ) агрегация при инкубации разной продолжительности суспензии тромбоцитов человека с различными концентрациями N-этилмалеимида NEM, а также прединкубации с NEM и последующей инкубацией с Гц

льфоизомераз, но и оксидоредуктаза Ego1, а также шаперон HSPA5. Физиологические концентрации низкомолекулярных тиолов потенцируют активацию тромбоцитов путем генерации вицинальных, т.е. стерически близких, тиоловых групп из редокс-чувствительных дисульфидных связей [10]. Таким образом, регуляция окислительно-восстановительного баланса, включая процессы окисления-восстановления дисульфидных связей, выполняющие и сигнальные функции, является важным элементом межклеточных взаимодействий в системе гемостаза.

В нашей работе действие Гц на агрегацию тромбоцитов заключалось преимущественно в дозозависимом росте агрегационной активности тромбоцитов кролика с максимумом для времени инкубации 45 мин в PRP. В WP и PRP агрегационная активность тромбоцитов уже при 5-минутной инкубации была достоверно выше контроля. Это может быть обусловлено, в частности, разрывом аллостерических дисульфидных связей фракцией восстановленного Гц и активацией ряда белков, участвующих в адгезии. При более длительных инкубациях с избытком Гц в суспензии дальнейшего роста активности не происходило. По-видимому, после добавления в плазму Гц (восстановленной формы) в сравнительно высокой концентрации происходит быстрое связывание Гц с альбумином, что снижает концентрацию свободного Гц. Отсроченный пик роста агрегационной активности тромбоцитов в плазме может быть обусловлен вторичными изменениями редокс-статуса тиолов в плазме и тиоловых групп на поверхности тромбоцитов. Так, например, тиолат-анион альбумина, образуемый в результате диссоциации сульфгидрильной группы Cys34, рКа которой составляет 5,0 [21], может взаимодействовать с гомоцистином или Гц-цистеин смешанным дисульфидом с образованием белок-связанного Гц. Таким образом, сложный характер зависимости агрегационной активности тромбоцитов в богатой плазме может быть обусловлен протекающими с разными скоростями реакциями тиол-дисульфидного обмена между смешанными дисульфидами, гомоцистином, гомоцистеином, альбумином, поверхностными белками тромбоцитов, что приводит к изменениям окислительно-восстановительного баланса микроокружения тромбоцитов.

Кроме того, побочными продуктами окисления Гц могут быть активные формы кислорода (АФК) [15]. Различия между АДФ-индуцированной агрегацией тромбоцитов в PRP и WP в присутствии Гц могут быть обусловлены окисленными ЛПНП [1, 7]. Рост агрегационной активности при инкубации с Гц был более выражен у тромбоцитов кролика по сравнению с тромбоцитами человека, и характерен для невысоких концентраций Гц.

В нашем исследовании мы показали, что NEM дозозависимо ингибирует агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ. Известно, что NEM эффективно блокирует сульфгидрильные группы, что, по-видимому, в данном случае приводит к исключению части тиолов из процессов адгезии и агрегации и соответствующему снижению агрегационной активности. В ряде других работ обнаружены сходные эффекты NEM, в частности, при использовании в качестве индуктора тромбина [14]. Предварительная инкубация с NEM полностью устраняет эффект увеличения агрегационной активности, индуцируемый Гц. Следует отметить, что расположение пика агрегационной активности на временной шкале практически не зависит от концентрации Гц в плазме, т.е. временные максимумы агрегационной активности тромбоцитов для концентраций 10, 50 и 100 мкМ достаточно близки. Для объяснения этого явления требуется проведение дополнительных исследований. Необходимо отметить, что зависимости влияния NEM на агрегационную активность тромбоцитов от времени инкубации с NEM нами достоверно не зафиксировано для использованного диапазона концентраций NEM.

Наблюдаемое увеличение агрегационной активности тромбоцитов при инкубации с Гц может быть связано с его участием в реакциях тиол-дисульфидного обмена с рядом поверхностных белков. В исследовании [16] показано, что восстановитель дитиотрейтол усиливал агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ или коллагеном. Дозозависимый эффект Гц на агрегацию был отмечен нами и в случае индукции тромбином в суспензии тромбоцитов. Это может указывать на возможное модулирование ряда рецепторов тромбоцитов, участвующих в адгезии и агрегации, в частности,  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, GPVI [16].

Сравнение агрегационной активности при индукции АДФ и тромбином в суспензии тромбоцитов кролика показывает, что в течение 120 мин клетки остаются функционально состоятельными, а существенно снижается только АДФ-индуцированная активность. Дозозависимое снижение чувствительности тромбоцитов к АДФ на более поздних сроках инкубации при инкубации WP с Гц может быть связано с инактивацией рецептора к АДФ. В данном случае нельзя исключать окислительно-восстановительный механизм модификации рецепторов к АДФ. Рецепторы типа P2Y имеют ряд дисульфидных связей и сульфгидрильных групп. В частности, наиболее представленный среди P2Y рецепторов вид P2Y<sub>12</sub> имеет тиоловые группы у Cys17 и Cys270, являющиеся мишенями для соединений, реагирующих с тиоловыми группами.

Характер изменения агрегационной активности в PRP и в WP, индуцированной тромбином, в присут-

ствии Гц (постепенное достижение максимума и последующее постепенное снижение — рис. 4) позволяет предположить дополнительные возможные механизмы снижения агрегации — постепенное ингибирование активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы [23], а также дисфункция эндоплазматического ретикулаума тромбоцитов [26].

Таким образом, в нашей работе впервые показана двухфазная временная зависимость агрегации тромбоцитов, опосредованной активацией рецептора к АДФ, при инкубации с Гц *in vitro*, которая носит выраженный дозависимый характер. Кроме перечисленных для интерпретации возможных механизмов, нельзя исключать и другие, преимущественно отсроченные и не опосредованные рецепторами эффекты Гц на функциональное состояние тромбоцитов. Они могут быть обусловлены внутриклеточными процессами, которые меняют активность рецепторов, ионных каналов и других сигнальных белков [1, 9]. Наши результаты, а также анализ литературных данных свидетельствуют в большей степени о многофакторном характере влияния Гц на функциональное состояние тромбоцита.

Интересно отметить, что при использовании более высоких доз индукторов агрегации, как АДФ, так и тромбина, различия агрегационной активности тромбоцитов в опытных и контрольных образцах были менее выражены (данные не приводятся), что позволяет рекомендовать низкие дозы индукторов для исследования действия Гц на тромбоциты.

### Список литературы

1. **Бочков В.Н., Ткачук В.А.** Влияние липопротеидов на системы передачи регуляторных сигналов в тромбоцитах и клетках сосудистой стенки // Рос. Физиол. Журн. им. Сеченова. — 2005. — Т. 91, №1. — С. 12—30.
2. **Иванов А.В., Лузянин Б.П., Московцев А.А., Поткина А.С., Кубатиев А.А.** Определение содержания общего гомоцистеина в плазме крови методом капиллярного электрофореза с масс-спектрометрическим детектированием // Аналитическая химия. — 2011. — Т. 3. — С. 317—321.
3. **Austin R.C., Lentz S.R., Werstuck G.H.** Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease // Cell Death Differ. — 2004. — Vol. 11, №7. — Suppl. 1. — P. 56—64.
4. **Bocci V., Valacchi G., Corradeschi F., Aldinucci C., Silvestri S., Paccagnini E., Gerli R.** Studies on the biological effects of ozone. Generation of reactive oxygen species (ROS) after exposure of human blood to ozone // J. Biol. Regul. Homeost. Agents. — 1998. — Vol. 12, №3. — P. 67—75.
5. **Burgess J.K., Hotchkiss K.A., Suter C., Dudman N.P., Szollosi J., Chesterman C.N., Chong B.H., Hogg P.J.** Physical proximity and functional association of glycoprotein Iba and protein-disulfide isomerase on the platelet plasma membrane // J. Biol. Chem. — 2000. — Vol. 275. — P. 9758—9766.
6. **Carmel R., Jacobsen D.W.** Homocysteine in Health and Disease // Cambridge University Press. — 2001. — P. 510.
7. **Coppola A., Davi G., De Stefano V., Mancini F.P., Cerbone A.M., Di Minno G.** Homocysteine, coagulation, platelet function, and thrombosis // Semin. Thromb. Hemost. — 2000. — Vol. 26, №3. — P. 243—254.
8. **Dardik R., Varon D., Tamarin I., Zivelin A., Salomon O., Shenkman B., Savion N.** Homocysteine and oxidized low density lipoprotein enhanced platelet adhesion to endothelial cells under flow conditions: distinct mechanisms of thrombogenic modulation // Thromb Haemost. — 2000. — Vol. 83, №2. — P. 338—344.
9. **Essex D.W., Li M.** Redox modification of platelet glycoproteins // Curr. Drug Targets. — 2006. — Vol. 7, №10. — P. 1233—1241.
10. **Essex D.W., Li M.** Redox control of platelet aggregation // Biochemistry. — 2003. — Vol. 42. — P. 129—136.
11. **Essex D.W., Li M., Feinman R.D., Miller A.** Platelet surface glutathione reductase-like activity // Blood. — 2004. — Vol. 104. — P. 1383—1385.
12. **Gitler C., Zarmi B., Kalef E.** Use of cationic detergents to enhance reactivity of protein sulfhydryls // Methods Enzymol. — 1995. — Vol. 251. — P. 366—375.
13. **Jakubowski H.** The molecular basis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease // Clin. Chem. Lab. Med. — 2007. — Vol. 45, №12. — P. 1704—1716.
14. **Leoncini G., Signorello M.G.** N-ethylmaleimide inhibition of thrombin-induced platelet aggregation // Biochem. Pharmacol. — 1999. — Vol. 58. — P. 1293—1299.
15. **Margalit M., Attias E., Attias D., Elstein D., Zimran A., Matzner Y.** Effect of ozone on neutrophil function in vitro // Clin. Lab. Haematol. — 2001. — Vol. 23, №4. — P. 243—247.
16. **Margaritisa A., Prioraa R., Frosali S., Giuseppa D., Summaa D., Coppoa L., Stefanob A., Simplicioa P.** The role of protein sulfhydryl groups and protein disulfides of the platelet surface in aggregation processes involving thiol exchange reactions // Pharmacological Research. — 2011. — Vol. 63. — P. 77—84.
17. **Mutus B., Rabini R.A., Staffolani R., Ricciotti R., Fumelli P., Moretti N., Martarelli D., Mazzanti L.** Homocysteine-induced inhibition of nitric oxide production in platelets: a study on healthy and diabetic subjects // Diabetologia. — 2001. — Vol. 44, №8. — P. 979—982.
18. **Nightingale A.K., James P.P., Morris—Thurgood J., Harrold F., Tong R., Jackson S.K., Cockcroft J.R., Frenneaux M.P.** Evidence against oxidative stress as mechanism of endothelial dysfunction in methionine loading model // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. — 2001. — Vol. 280, №3. — P. H1334—9.
19. **Olas B., Kedzierska M., Wachowicz B.** Comparative studies on homocysteine and its metabolite-homocysteine thiolactone action in blood platelets *in vitro* // Platelets. — 2008. — Vol. 19, №11. — P. 520—527.
20. **Riba R., Nicolaou A., Troxler M., Homer-Vaniasinkam S., Naseem K.M.** Altered platelet reactivity in peripheral vascular disease complicated with elevated plasma homocysteine levels // Atherosclerosis. — 2004. — Vol. 175, №7. — P. 69—75.
21. **Sengupta S., Chen H., Togawa T., DiBello P.M., Majors A.K., Budy B., Ketterer M.E., Jacobsen D.W.** Albumin thiolate anion is an intermediate in the formation of albumin-S-homocysteine // J. Biol. Chem. — 2001. — Vol. 276. — P. 30111—30117.
22. **Signorello M.G., Pascale R., Leoncini G.** Effect of homocysteine on arachidonic acid release in human platelets // Eur. J. Clin. Invest. — 2002. — Vol. 32, №4. — P. 279—284.

23. *Stefanello F.M., Franzon R., Wannmacher C.M., Wajner M., Wyse A.T.* In vitro homocysteine inhibits platelet  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and serum butyrylcholinesterase activities of young rats // *Metab. Brain Dis.* — 2003. — Vol. 18, №4. — P. 273–280.

24. *Zaichko N.V., Pentiuk O.O., Karbovs'kyi V.L.* Effect of homocysteine, cysteine, and their derivatives on the platelet link of hemostasis system // *Ukr. Biokhim. Zh.* — 2007. — Vol. 79, №5. — P. 122–132.

25. *Zanin R.F., Campesato L.F., Braganhol E., Schetinger M.R., Wyse A.T., Battastini A.M.* Homocysteine decreases extracellular nucleotide hydrolysis in rat platelets // *Thromb Res.* — 2010. — Vol. 125, №3. — P. 87–92.

26. *Zbidi H., Redondo P.C., Lopez J.J., Bartegi A., Salido G.M., Rosado J.A.* Homocysteine induces caspase activation by endoplasmic reticulum stress in platelets from type 2 diabetics and healthy donors // *Thromb Haemost.* — 2010. — Vol. 3, 103, №5. — P. 1022–1032.

27. *Zhang L., Zhang G.* Thrombosis induced by homocysteine does not depend on platelet aggregation or heparin cofactor's antithrombin activity // *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao.* — 1999. — Vol. 24, №4. — P. 309–312, 340.

Поступила 01.03.12

#### Сведения об авторах:

*Романова Елизавета Петровна*, канд. биол. наук, вед. научн. сотр. лаб. молекулярных механизмов тромбогенеза и тромболизиса ФГБУ «НИИОПП» РАМН

*Московцев Алексей Алексеевич*, канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаб. молекулярных механизмов тромбогенеза и тромболизиса ФГБУ «НИИОПП» РАМН

*Кубатиев Аслан Амирханович*, д-р мед. наук, проф., акад. РАМН, зав. лаб. молекулярных механизмов тромбогенеза и тромболизиса, дир. ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Г.Ф. Лескова<sup>1</sup>, Г.Н. Крыжановский<sup>1</sup>, В.И. Швец<sup>1,2</sup>, Ю.М. Краснопольский<sup>3</sup>

## **Лечебное воздействие липосом при геморрагическом шоке (экспериментальное исследование)**

<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> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова», 119571, Москва, пр. Вернадского, 86

<sup>3</sup> Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт», Украина, 61002, Харьков, ул. Фрунзе, 21

*В опытах на кошках, переживающих геморрагический шок, установлено корректирующее воздействие фосфатидилхолин-содержащих липосом на структуру легких, печени, головного мозга и селезенки. Показано, что липосомы обладают антиоксидантным действием и способны восстанавливать поврежденный фосфолипидный бислой клеточных мембран. Применение липосом на поздней стадии геморрагического шока вызывает в среднем в течение 30 мин повышение артериального давления в среднем до 70 мм рт.ст. (до уровня, при котором прекращается дальнейшее разрушение клеток). Стабилизацию артериального давления на субнормальном уровне наблюдали в среднем в течение 4 ч. Продолжительность жизни животных увеличилась в среднем на 7 часов. Липосомы применяются в небольшом объеме (1 мл/кг) и могут быть использованы для оказания первой медицинской помощи на ранних и поздних стадиях геморрагического шока, а также в комплексной терапии геморрагического шока.*

**Ключевые слова:** геморрагический шок, фосфатидилхолин, липосомы

G.F. Leskova<sup>1</sup>, G.N. Kryzhanovskij<sup>1</sup>, V.I. Shvets<sup>1,2</sup>, U.M. Krasnopolsky<sup>3</sup>

## **The treat effect of liposomes during haemorrhagic shock (experimental research)**

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

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow University of Fine Chemical Technology, 86, Prospect Vernadskogo, Moscow, 117571, Russia

<sup>3</sup> Kharkiv Polytechnic Institute, 21, Frunze str., 61002, Kharkiv, Ukraine

*In experiences on the cats subjected to haemorrhagic shock, it is established the correction effect of phosphatidylcholine-containing liposomes on structure of lungs, a liver, a brain and a spleen. It is shown, that liposomes possess antioxidant action and are capable to restore the damaged phospholipid bilayer of cellular membranes. Application of liposomes at a late stage of haemorrhagic shock causes on the average during 30 mines increase of arterial pressure on the average to 70 mm hg (to level at which the further destruction of cells stops). Stabilisation of arterial pressure at sub-normal level observed on the average during 4 ч. Animals viability increased on the average at 7 o'clock. Liposomes applied in small volume (1 ml/kg) and can be used for rendering of the first medical aid at early and late stages of haemorrhagic shock, and also in complex therapy of haemorrhagic shock.*

**Key words:** haemorrhagic shock, phosphatidylcholine, liposomes

Проблема геморрагического шока остается одной из актуальных областей современной медицинской науки и практического здравоохранения. Несмотря на то, что в последние десятилетия имели место значительные достижения в области хирургии, реаниматологии и трансфузиологии, массивная потеря крови является основной причиной летальности при сложных хирургических операциях, некоторых заболеваниях, ранениях и травмах [12, 14]. В акушерской практике с кровотечениями связано 20—25% материнской смертности

[11]. Особенную важность проблема массивной потери крови, сопровождающейся геморрагическим шоком, приобретает в военно-полевой хирургии, учитывая, что большинство раненых поступает в позднем периоде шока, когда общепринятые методы лечения, в том числе и массивная трансфузионно-инфузионная терапия, часто оказываются неэффективными. В связи с вышесказанным возникает необходимость дальнейшего изучения механизмов шокогенных повреждений и поиска лечебных мероприятий, направленных на существенное повышение эффективности терапии вызванного массивной кровопотерей геморрагического шока, прежде всего, в его позднем периоде.

**Для корреспонденции:** Лескова Галина Федоровна, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. комбинированных повреждений и шока ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: niiopp@mail.ru



Следует отметить, что хотя повреждения, вызванные шоком, имеют место как на системном, так и на клеточном уровнях, в конечном счете именно гибель клеток определяет его исход. Существенной характеристикой, определяющей функциональную активность клеток органов и тканей, является структура их мембран и, в частности, фосфолипидный (ФЛ) состав последних, поскольку с ФЛ связан ряд важнейших клеточных функций. Установлено, что в условиях геморрагического шока повреждение клеточных мембран определяется зачастую прогрессивным падением содержания фосфатидилхолина (ФХ) [7—10]. В связи с этим и с учетом антиоксидантных свойств ФХ [2] были предприняты исследования, направленные на восстановление уровня ФХ в мембранах и снижение активации свободнорадикальных процессов путем введения в организм кошек, переживающих геморрагический шок, ФХ-липосом. Учитывая, что в отличие от других видов шока (травматического, эндотоксического) геморрагический шок вызывает снижение уровня липидов крови [6], полагали, что в условиях геморрагического шока частичный гидролиз ФХ в кровеносном русле с освобождением свободных жирных кислот не приведет к отрицательным побочным явлениям. Следует отметить, что липосомы широко используются в медицинских и биологических исследованиях. Установлена эффективность их клинического применения [1, 3, 16].

### Методика

Опыты выполнены на 152 кошках массой  $3,0 \pm 0,5$  кг под нембуталовым наркозом (40 мг/кг внутривенно). Усыпление животных проводили внутривенным введением нембутала в дозе 90 мг/кг. В первой серии опытов изучали влияние липосом на динамику системного артериального давления у кошек с геморрагическим шоком и на их выживаемость. Геморрагический шок воспроизводили по методу Уиггера—Файна в течение 2 ч (артериальное давление снижали до 40 мм рт. ст. в течение 30—40 мин и поддерживали его на этом уровне в течение 1,5 ч, после чего прерывали сообщение между сосудистым руслом и резервуаром для кровопускания). Липосомы, приготовленные по методу [9], в дозе 1 мл/кг вводили в/в через 2 ч от начала кровопотери. Использовали два вида липосом: свежеприготовленные (ФХ-липосомы) и стабилизированные, хранившиеся перед употреблением в течение 12 мес. при температуре  $-18^\circ\text{C}$  (СТ-липосомы). Во второй серии опытов было проведено гистологическое изучение состояния органов (легких, печени, головного мозга, селезенки, почек и сердца). Воспроизведение геморрагического шока и воздействие липосомами проводили по указанной выше схеме.

Из подопытных кошек составили 3 группы:

- 1-я группа — геморрагический шок (павшие);
- 2-я группа — геморрагический шок с лечением ФХ-липосомами и усыплением нембуталом через 70 мин после введения липосом (в срок, составлявший среднюю продолжительность жизни нелеченых животных);
- 3-я группа — геморрагический шок с лечением ФХ-липосомами и усыплением нембуталом через 8 ч после введения липосом (в срок, составлявший среднюю продолжительность жизни леченых животных).

Материал для гистологического исследования собирали при полном системном вскрытии по Шору. Методом световой микроскопии исследованы замороженные срезы легких, печени, селезенки, почек и сердца, окрашенные по Гольдману гематоксилином-эозином и пикрофуксином-фуксиленом по Харту, а также срезы головного мозга, окрашенные по Нислю. В третьей серии опытов изучали биохимические показатели. Подопытные животные были разделены на следующие группы: 1 — интактные кошки, которым вводили гепарин в дозе 2000 ЕД/кг, использовавшийся при моделировании геморрагического шока (контроль); у кошек 2-й группы воспроизводили геморрагический шок в течение 1,5 ч (артериальное давление снижали в течение 30 — 40 мин до 40 мм рт.ст. и поддерживали его на этом уровне 1 ч); у кошек 3 группы воспроизводили геморрагический шок по указанной выше схеме, но через 30 мин от начала кровопотери в/в в дозе 1 мл/кг вводили ФХ-липосомы. Кровопотеря у кошек, произведенная в течение 1,5 ч, составила  $3,6 \pm 0,1$  % к массе тела, а в течение 2 ч —  $3,9 \pm 0,2$  %. Для биохимических исследований отбирали ткани печени и головного мозга после усыпления животных нембуталом. Плазматические мембраны клеток печени выделяли по методу [13] в модификации [15]. В основу использовавшегося метода выделения митохондрий головного мозга положены работы [19] и [17]. Выделение мембран митохондрий головного мозга проводили по методу [18]. Общие липиды из выделенных мембран экстрагировали по Фолчу. Фосфолипиды (ФЛ) разделяли на фракции с помощью тонкослойной хроматографии [4]. Хроматограммы денситометрировали на «Chromoscan-201» фирмы «Jouce-Loebl» (Великобритания). Обсчет денситограмм проводили на полуавтоматическом анализаторе изображений «Leitz A.S.M.» Определение содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в печени проводили по методу [21] в модификации [5]. Содержание белка в гомогенате печени определяли по методу [20]. Липосомы готовили по методу [10]. Для оценки результатов исследований использовали метод Стюдента.

### Результаты и обсуждение

У нелеченых животных, перенесших 2-часовую гипотензию, наблюдали прогрессивное снижение системного артериального давления (АД), и они погибли в среднем через 70 мин (таблица). Внутривенное введение кошкам свежеприготовленных ФХ-липосом через 2 ч от начала кровопотери вызывало повышение АД в течение 20—30 мин в среднем до 70 мм рт. ст. Далее имела место стабилизация АД на субнормальном уровне в течение 4 ч наблюдений. Продолжительность жизни таких животных составляла в среднем 8 ч. Сходные результаты получали при применении СТ-липосом.

Морфологические изменения, вызванные геморрагическим шоком, характеризовались наличием в легких альтераций в стенках альвеол и бронхиол в виде очагового лизирования выстилающего эпителия, сопровождавшихся дистелектазом. Отечная периваскулярная и перибронхиальная строма была инфильтрирована гранулоцитами. Имели место эритродиapedез, эритро- и лейкостазы в капиллярах и венах. Через 70 мин после введения ФХ-липосом животным, перенесшим 2-часовую гипотензию, проявления отека легких уменьшались. Наблюдали венулостазы, появление макрофагов в просвете альвеол. Отмечали полнокровие так называемых «широких» капилляров. При более позднем наблюдении (8 ч после введения липосом) морфологическая картина легких осложнялась появлением в просвете альвеол серозно-геморрагической эксудации.

В препаратах печени при геморрагическом шоке наблюдали запускание венул и синусоидов. В цитоплазме гепатоцитов имела место жировая и вакуолярная дистрофия. У животных, леченных ФХ-липосомами, при обоих вышеуказанных сроках наблюдений в гепатоцитах отсутствовали проявления жировой и вакуолярной дистрофии, в просвете синусоидов встречались форменные элементы крови, отек стенок микрососудов уменьшался. Вместе с тем, наблюдали некоторые признаки дисконфлексии долек печени и наличие очажков лимфоидно-клеточной инфильтрации стромы. Изредка находили признаки деструкции гепатоцитов.

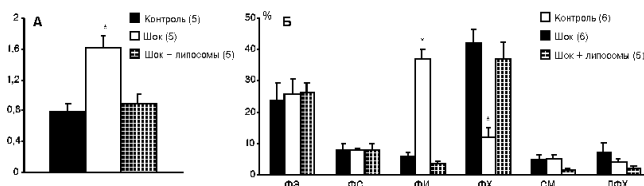
В препаратах головного мозга кошек, переживающих геморрагический шок, отмечали периделлюлярный отек. Наблюдали дегенеративные формы нейронов, а также выпадение последних. При лечении таких кошек ФХ-липосомами проявления отека мозга не уменьшались, однако сократилось количество безъядерных клеток.

В селезенке у кошек с геморрагическим шоком было установлено обеднение запасов эритроцитов в красной пульпе и расширение реактивных центров лимфатических фолликулов. У кошек, леченных ФХ-липосомами, в препаратах селезенки выявили отчетливое увеличение красной пульпы, характерное для синдрома усиления утилизационной функции селезенки по отношению к эритроцитам, подвергшимся патологическим изменениям. В целом, у этих живот-

Таблица

Динамика артериального давления (мм рт. ст.) у кошек, подвергнутых геморрагическому шоку

Время наблюдений, мин	Шок (n=10)	Шок + ФХ-липосомы (n=11)	Шок + СТ-липосомы (n=8)
0	40,0±0,0 (n <sub>1</sub> =10)	40,0±0,0 (n <sub>1</sub> =11)	40,0±0,0 (n <sub>1</sub> =8)
30	30,0±2,4 (n <sub>1</sub> =10)	71,8±4,0 (n <sub>1</sub> =11)	63,8±4,2 (n <sub>1</sub> =8)
60	19,0±5,5 (n <sub>1</sub> =7)	73,6±5,9 (n <sub>1</sub> =11)	67,5±7,8 (n <sub>1</sub> =8)
90	9,0±4,3 (n <sub>1</sub> =4)	73,9±6,9 (n <sub>1</sub> =11)	65,0±9,4 (n <sub>1</sub> =8)
120	5,5±3,9 (n <sub>1</sub> =2)	70,0±8,4 (n <sub>1</sub> =11)	61,9±10,2 (n <sub>1</sub> =8)
140	0,0±0,0 (n <sub>1</sub> =0)	75,7±10,8 (n <sub>1</sub> =11)	61,2±9,5 (n <sub>1</sub> =8)
150		77,1±10,6 (n <sub>1</sub> =11)	61,9±10,0 (n <sub>1</sub> =8)
180		63,6±10,3 (n <sub>1</sub> =10)	59,4±10,4 (n <sub>1</sub> =8)
210		62,3±8,6 (n <sub>1</sub> =10)	49,4±10,6 (n <sub>1</sub> =8)
240		55,9±12,0 (n <sub>1</sub> =9)	45,6±11,4 (n <sub>1</sub> =8)
300		43,6±12,1 (n <sub>1</sub> =7)	36,2±10,9 (n <sub>1</sub> =7)
360		38,2±9,2 (n <sub>1</sub> =6)	26,9 + 9,7 (n <sub>1</sub> =5)
420		30,9±10,7 (n <sub>1</sub> =5)	21,4±10,3 (n <sub>1</sub> =3)
540		25,9±9,3 (n <sub>1</sub> =4)	15,4±8,0 (n <sub>1</sub> =3)
660		14,0±9,4 (n <sub>1</sub> =2)	5,7±4,2 (n <sub>1</sub> =2)
720		6,8±6,8 (n <sub>1</sub> =1)	2,8±2,8 (n <sub>1</sub> =1)
900		4,5±4,5 (n <sub>1</sub> =1)	0,0±0,0 (n <sub>1</sub> =0)
1080		0,0±0,0 (n <sub>1</sub> =0)	



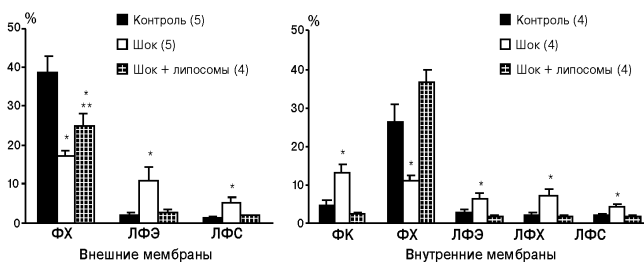
**Рис. 1.** Воздействие ФХ-липосом на содержание ТБК-активных продуктов (в нмоль/мг белка) в печени (А) и фосфолипидный состав (%) плазматических мембран гепатоцитов (Б): ФЭ – фосфатидилэтанолламин; ФС – фосфатидилсерин; ФИ – фосфатидилинозитол; ФХ – фосфатидилхолин; СМ – сфингомиелин; ЛФХ – лизофосфатидилхолин.  
\* –  $P < 0,05$  по сравнению с контрольными показателями. Здесь и на рис. 2 и 3: в скобках – количество животных.

ных морфологическая картина селезенки была сходной на ранних и поздних сроках наблюдений.

В почках кошек, перенесших геморрагический шок, имели место тяжелые деструктивные изменения аппарата клубочков и эпителия мочевыводящих канальцев. В сердце отмечали множественные микрокровоизлияния, патологические изменения в стенках интрамуральных артерий. Введение ФХ-липосом кошкам с геморрагическим шоком не изменило описанную выше морфологическую картину почек и сердца.

Через 1,5 ч от начала кровопотери уровень ТБК-активных продуктов в печени превышал таковой в контроле в 2,0 раза ( $p < 0,01$ ) (рис. 1). При этом отмечена обратная зависимость между усилением ПОЛ и содержанием ФХ в плазматических мембранах гепатоцитов, которое уменьшилось в 3,2 раза ( $p < 0,01$ ) ( $r = -0,79$ ). Значительное увеличение содержания фосфатидилинозида (ФИ) в плазматических мембранах гепатоцитов через 1,5 ч от начала кровопотери (превышало контрольные значения в 6,1 раза;  $p < 0,01$ ) прямо коррелировало с усилением ПОЛ ( $r = 0,72$ ).

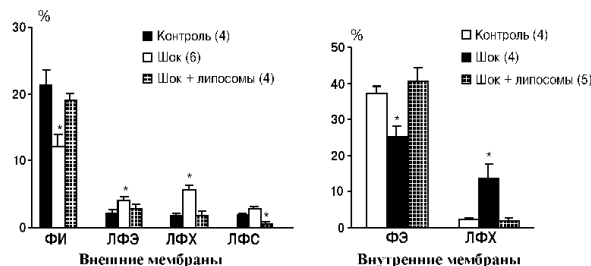
Применение ФХ-липосом через 30 мин от начала кровопотери снизило уровень ТБК-активных продуктов в печени у животных, подвергнутых геморра-



**Рис. 2.** Влияние ФХ-липосом на состав (%) фосфолипидов мембран митохондрий продолговатого мозга: ФХ – фосфатидилхолин; ЛФЭ – лизофосфатидилэтанолламин; ЛФС – лизофосфатидилсерин; ФК – фосфатидная кислота; ЛФХ – лизофосфатидилхолин.  
\* –  $P < 0,05$  по сравнению с контрольными показателями; \*\* –  $P < 0,05$  по сравнению с показателями у нелеченых животных.

гическому шоку, в 1,8 раза ( $p < 0,01$ ), приблизив его к контрольному. Параллельно отмечали восстановление до контрольного показателя уровня ФХ в плазматических мембранах гепатоцитов, которое коррелировало со снижением уровня продуктов ПОЛ в печени ( $r = -0,67$ ). Введение ФХ-липосом положительно отразилось на обмене ФИ: содержание данного ФЛ в плазматических мембранах гепатоцитов также не отличалось от контрольного показателя, причем нормализация обмена ФИ коррелировала со снижением уровня продуктов ПОЛ в печени ( $r = 0,75$ ). Таким образом, применение ФХ-липосом на ранней стадии развития геморрагического шока у кошек препятствует активации ПОЛ в печени и изменению ФЛ-спектра плазматических мембран гепатоцитов.

Отличительной чертой последствий геморрагического шока было прогрессивное исчезновение ФХ из мембран митохондрий продолговатого мозга: его уровень по сравнению с контрольным оказался сниженным в 2,2 раза ( $p < 0,05 - 0,01$ ) (рис. 2). Кроме того, в этих мембранах в значительном количестве накапливались лизоформы ФЛ. Во внешних и внутренних мембранах митохондрий уровень лизо-ФХ увеличился в 5,2 и 3,0 раза соответственно ( $p < 0,5$ ), а лизофосфатидилсерина (лизо-ФС) — в 4 и 2 раза ( $p < 0,05 - 0,01$ ). Во внутренних мембранах этих митохондрий повышался уровень лизофосфатидилэтанолламина (лизо-ФЭ) — в 2,2 раза ( $p < 0,5$ ), что сочеталось с увеличением содержания фосфатидной кислоты в 2,8 раза ( $p < 0,2$ ). У животных, перенесших геморрагический шок, но леченных ФХ-липосомами, во внешних мембранах митохондрий продолговатого мозга уровень ФХ по сравнению с нелечеными животными повысился на 43,7% ( $p < 0,05$ ), оставаясь ниже контрольного показателя на 35,2% ( $p < 0,05$ ). Во внутренних мембранах митохондрий наблюдали полное восстановление концентрации данного ФЛ. Кроме того, во внутренних мембранах нормализовалось содержание фосфатидной кислоты. Уровень ли-



**Рис. 3.** Влияние ФХ-липосом на состав (%) фосфолипидов мембран митохондрий лобных долей больших полушарий головного мозга: ФИ – фосфатидилинозитол; ЛФЭ – лизофосфатидилэтанолламин; ЛФХ – лизофосфатидилхолин; ЛФС – лизофосфатидилсерин; ФЭ – фосфатидилэтанолламин.  
\* –  $P < 0,05$  по сравнению с контрольными показателями.

зо-ФЛ во внешних и внутренних мембранах митохондрий продолговатого мозга также соответствовал контрольным показателям. Таким образом, применение ФХ-липосом у кошек, подвергнутых геморрагическому шоку, обусловило существенную нормализацию фосфолипидного состава мембран митохондрий продолговатого мозга.

У животных, переживающих геморрагический шок, во внешних мембранах митохондрий лобных долей больших полушарий головного мозга наблюдали уменьшение содержания ФИ на 42,7% ( $p < 0,02$ , рис. 3). Во внутренних мембранах этих митохондрий уменьшалось содержание фосфатидилэтаноламина (ФЭ) на 32% ( $p < 0,02$ ). Имело место накопление лизоформ ФЛ: повышение уровня лизо-ФХ наблюдали как во внешних (в 3,3 раза;  $p < 0,01$ ), так и во внутренних (в 6,2 раза;  $p < 0,02$ ) мембранах митохондрий, а лизо-ЛФЭ накапливался во внешних мембранах митохондрий (увеличился по сравнению с контрольным показателем в 1,9 раза;  $p < 0,05$ ).

При применении ФХ-липосом у животных, подвергнутых геморрагическому шоку, во внешних мембранах митохондрий лобных долей больших полушарий головного мозга восстанавливалось содержание ФИ, что сочеталось с восстановлением содержания ФЭ во внутренних мембранах этих митохондрий. Кроме того, при лечении животных с геморрагическим шоком ФХ-липосомами в мембранах митохондрий лобных долей больших полушарий головного мозга снизилось содержание лизо-ФЛ. Как во внутренних, так и во внешних мембранах данных митохондрий до контрольных показателей восстанавливалось содержание лизо-ФХ. Во внешних мембранах уровень лизо-ФЭ соответствовал контрольному, а концентрация лизо-ФС оказалась ниже контрольной в 3,3 раза ( $p < 0,001$ ). Таким образом, особенностью применения ФХ-липосом при геморрагическом шоке является коррекция уровня ФЛ в мембранах митохондрий лобных долей больших полушарий головного мозга.

Проведенные исследования показали, что ФХ-липосомы обладают значительным преимуществом по сравнению с другими известными корректорами геморрагического шока, что проявляется в первую очередь в их мембрано-стабилизирующем действии. В частности, лечение геморрагического шока известными фармакологическими препаратами (супероксиддисмутазой, дилтиаземом, бупренорфином, буторфанолом) сопровождается лишь частичным восстановлением в плазматических мембранах гепатоцитов содержания ФЛ, ответственных за поддержание внутриклеточного гомеостаза и клеточную сигнализацию [8], в то время как при применении ФХ-липосом у кошек, переживающих геморрагический шок, состав

ФЛ плазмалеммы гепатоцитов полностью соответствует таковому интактных животных. Кроме того, применение ФХ-липосом на фоне геморрагического шока положительно воздействует на структуру клеток головного мозга, способствуя восстановлению ФЛ-бислоя мембран митохондрий. Одновременно ФХ-липосомы позволяют стабилизировать АД на субнормальном уровне в течение длительного времени. Сочетание указанных свойств ФХ-липосом позволяет в значительной степени решить задачу облегчения течения геморрагического шока не только на ранней стадии его развития, но и на его позднем этапе, характеризующемся стабильно высокой летальностью. В настоящее время нет средства, равного ФХ-липосомам, по эффективности лечения геморрагического шока. Лекарственная форма липосом стабильна в процессе хранения и может быть применена для профилактики геморрагического шока при массивной кровопотере, для оказания первой медицинской помощи на ранних и поздних стадиях геморрагического шока, а также в комплексной терапии геморрагического шока.

### Список литературы

1. *Атаулаханов Р.И., Хаитов Р.М.* Адьюванты в составе вакцин. Сообщение 2. Масляные эмульсии, липосомы, виросомы, археосомы, экзосомы // Иммунология. — 2011. — Т. 32, №2. — С. 101–109.
2. *Бурлакова Е.Б., Крашаков С.А., Храпова Н.Г.* Роль токоферолов в пероксидном окислении липидов биомембран // Биол. мембр. — 1998. — Т. 15, №2. — С. 3–11.
3. *Каплун А.П., Ле Банг Шон, Краснополский Ю.М., Швец В.И.* Липосомы и другие наночастицы как средство доставки лекарственных веществ // Вопр. мед. химии. — 1999. — Т. 45. — Вып. 1. — С. 3–12.
4. *Каргаполов А.В., Карцова С.В.* Метод одновременного фракционирования основных фракций лизофосфолипидов и их диацильных производных // Вопр. мед. химии. — 1975. — Т. 21. — Вып. 3. — С. 325–327.
5. *Костюк В.А., Потапович А.И.* Определение продуктов перекисного окисления липидов с помощью тиобарбитуровой кислоты в анаэробных условиях // Вопр. мед. химии. — 1987. — Т. 33. — Вып. 3. — С. 115–118.
6. *Левин Г.С., Каменецкая Ц.Л.* Метаболизм липидов при кровопотере и шоке. — Ташкент: Медицина, 1982. — 168 с.
7. *Лескова Г.Ф.* Роль нарушений липидного обмена в патологии геморрагического шока и пути их коррекции // Усп. совр. биол. — 2001. — Т. 121, №1. — С. 78–89.
8. *Лескова Г.Ф.* Изменения состава фосфолипидов синаптических мембран лобных долей больших полушарий головного мозга кошек на разных стадиях геморрагического шока // Бюл. эксп. биол. и мед. — 2008. — Т. 146, №10. — С. 381–384.
9. *Лескова Г.Ф., Крыжановский Г.Н.* Изменения состава фосфолипидов плазматических мембран кардиомиоцитов при геморрагическом шоке // Бюл. эксп. биол. и мед. — 2011. — Т. 151, №3. — С. 255–258.

10. *Лескова Г.Ф., Крыжановский Г.Н., Архипенко Ю.В.* и др. Способ коррекции геморрагического шока. Пат. РФ №2191583. — 2002.

11. *Миронова Т.А.* Современные аспекты профилактики и терапии массивных акушерских кровотечений // Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины. — Киров: НИИ гематологии и переливания крови, 1995. — С. 132—133.

12. *Мороз В.В., Крылов Н.Л., Иваницкий Г.Р.* и др. Применение перфторана в клинической медицине // Анестезиология и реаниматология на рубеже XXI века. — 1995. — №6. — С. 12—17.

13. *Невилл Д.* Получение фракций, обогащенных поверхностными клеточными мембранами // Биохимическое исследование мембран. — М.: Мир, 1979 (1976). — С. 30—53.

14. *Неговский В.А.* Старые и новые проблемы реаниматологии // Анестезиология и реаниматология. — 1996. — №5. — С. 4—9.

15. *Поспелова А.В.* Выделение плазматических мембран клеток печени // Современные методы в биохимии. — М.: Медицина, 1977. — С. 326—329.

16. *Тазина Е.В., Костин К.В., Оборотова Н.А.* Особенности инкапсулирования лекарственных препаратов

в липосомы // Хим.-фарм. ж. — 2011. — Т. 45, №8. — С. 30—40.

17. *Diaz-Munoz M., Tapla R.* Functional changes of brain mitochondria during experimental hepatic encephalopathy // Biochem. Pharmacol. — 1989. — Vol. 38. — P. 3835—3841.

18. *Levy M., Toury R., Andre J.* Separation des membranes mitochondriales, purification et caracterisation enzymatique de la membrane externe // Biochim. Biophys. Acta. — 1967. — Vol. 135. — P. 599—613.

19. *Lovtrup S., Zelander T.* Isolation of brain mitochondria // Exp. Cell Research. — 1962. — Vol. 27. — P. 468—473.

20. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.

21. *Ohkawa M., Ohishi N., Yagi K.* Assay for lipid peroxides in animal tissue // Analyt. Biochem. — 1979. — Vol. 95. — P. 351—358.

Поступила 04.09.12

#### Сведения об авторах:

*Крыжановский Георгий Николаевич*, д-р мед. наук, проф., акад. РАМН, почётный директор ФГБУ «НИИОПП» РАМН, зав. отд. общей патологии нервной системы и лаб. патофизиологии нервной системы

*Швец Виталий Иванович*, д-р хим. наук, акад. РАМН, проф., зав. каф. биотехнологии ФГБОУ ВПО «МГАТХТ им. М.В. Ломоносова»

*Краснопольский Юрий Михайлович*, д-р фарм. наук, проф. каф. «Биотехнология и аналитическая химия» НТУ «ХПИ»

И.Н. Нечаев<sup>1</sup>, М.Ю. Шкурников<sup>1</sup>, Д.Г. Максименко<sup>2</sup>

## **Определение предрасположенности к развитию нарушений сердечно-сосудистой системы у молодых спортсменов Московского региона**

<sup>1</sup> ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

<sup>2</sup> Общество с ограниченной ответственностью Научно-технический центр «БиоКлиникум», 115088, Москва, ул. Угрешская, 2

*Определены частоты аллелей 234 испытуемых (состоящих из двух групп спортсменов: скоростно-силовой и циклической подготовкой) по 12 полиморфизмам. Были рассчитаны распределения частот кардиориска для группы контроля и двух групп спортсменов. Разработана методика индивидуальной оценки генетического кардиориска.*

**Ключевые слова:** кардиориск, сердечно-сосудистые заболевания, полиморфизм, аллель

I.N. Nechaev<sup>1</sup>, M.U. Shkurnikov<sup>1</sup>, D.G. Maximenko<sup>2</sup>

## **Determination of susceptibility to the development of disorders of the cardiovascular system in young athletes in the Moscow region**

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

<sup>2</sup> SRC «Bioclinicum», 2, Ugreshskaya str., Moscow, 115088, Russia

*The allele's frequencies of 234 subjects (consisting of two groups of athletes: speed-strength and cyclic training) of 12 polymorphisms. We calculated the frequency distribution cardiovascular risk for the control group and two groups of athletes. There was made the technique of an individual assessment of the genetic cardiovascular risk.*

**Key words:** cardiovascular risk, cardiovascular disease, polymorphism, allele

В России среди общей смертности доля заболеваний, приходящихся на сердечно-сосудистую систему составляет 57%. В последнее десятилетие самое пристальное внимание спортивных кардиологов обращено на выявление факторов риска внезапной сердечной смерти (ВСС) у спортсменов. Известно, что высококвалифицированные спортсмены имеют выраженные структурно-функциональные изменения сердца, которые связаны с видом спорта, полом, и генетическими факторами [19]. В ряде популяционных исследований показано, что смертность от сердечно-сосудистых заболеваний среди спортсменов от 12 до 35 лет в 2,5 раза превышает данный показатель для лиц, не занимающихся спортом [16]. К числу наиболее частых причин смерти от заболеваний сердечно-сосудистой системы (ССС) большинство зарубежных авторов относят гипертрофическую кардиомиопатию (60%), аномалии строения коронарных артерий (25%) и миокардиты (10%) [16].

В настоящее время для изучения границ индивидуальной адаптации к физическим нагрузкам используются молекулярно-генетические технологии. На данный момент найдено более 100 наследственных детерминант «спортивной успешности» в проявлении целого ряда физических качеств, комбинации которых дают возможность спортсменам с определенным набором данных генетических признаков доминировать в определенных видах спорта [5]. С другой стороны, отмечена ассоциация некоторых из «спортивных» полиморфизмов — кандидатов (*ACE*, *AGT*, *AGTR1*, *AGTR2*, *BDKRB2*, *GNB3*, *NOS3*, *AMPD1*, *ITGB3*, *ADRB2* и *PPARD*) с рядом заболеваний, таких, как гипертоническая и ишемическая болезнь сердца, аритмии, артериальная гипертензия [1, 3, 4, 9]. Предположительно специфические комбинации этих генетических факторов не только влияют на рост спортивных показателей, но и под воздействием спортивных нагрузок способствуют ускорению патологической трансформации спортивного сердца. Поэтому на сегодняшний день стала как никогда важна разработка ранней диагностики генетической предрасположенности к развитию ССЗ. Информация о суммарном сердечно-сосудистом риске и факторах,

**Для корреспонденции:** Нечаев Илья Николаевич, м.н.с., лаб. молекулярной физиологии ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: ilyanech@gmail.com

его определяющих, является важным инструментом, дающим врачу сведения о состоянии здоровья обследуемого человека, помогающим с выбором тактики ведения конкретного пациента, подборе действенных мер клинической профилактики.

Проведение одновременного анализа большого числа генов-кандидатов представляется на сегодняшний день очень сложной задачей. Поэтому необходимо выделение группы генов с потенциально наибольшим вкладом в патогенез заболевания, таких как гены ренин-ангиотензиновой системы, гены системы регуляции давления в кровяном русле (ренин, ангиотензиноген, брадикинин, ангиотензин-превращающий фермент и т.д.) [2, 8, 11, 14, 20], группа генов напрямую или опосредованно связанная с вторичными мессенджерами [13], компонентов системы свертывания крови [6], факторы пролиферации [7, 9], рецепторы вегетативной нервной системы [18].

Целью данного исследования было оценить предрасположенность к развитию нарушений сердечно-сосудистой системы (ССС) в зависимости от полиморфизмов генов *ACE*, *AGT*, *AGTR1*, *AGTR2*, *BDKRB2*, *GNB3*, *NOS3*, *AMPD1*, *ITGB3*, *ADRB2* и *PPARD*.

### Методика

В ходе работы были обследованы 234 мужчины в возрасте 16—35 лет, регулярно тренирующиеся, специализирующиеся в циклических и скоростно-силовых видах спорта, с квалификацией от 1 разряда до мастеров спорта международного класса (мастер спорта международного класса — 12,5%; мастер спорта — 32,5%; кандидат в мастера спорта — 39,5%; 1-й разряд — 15,5%). Все испытуемые давали письменное информированное согласие на участие в исследовании. В исследовании принимали участие спортсмены различной специализации. Спортсмены, специализирующиеся в скоростно-силовых видах спорта — 115 чел.,

(спринтерский бег, плавание) и 119 чел. группы циклических видов спорта (академическая гребля, байдарки и каноэ, шорт-трек, велоспорт, современное пятиборье, триатлон). Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБУ ФНЦ ВНИИФК.

Материалом для генетического исследования служила дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), выделенная из лейкоцитов периферической крови. Забор крови производился из локтевой вены. ДНК выделяли из 100 мкл цельной крови с помощью комплекта реагентов для выделения ДНК «Проба-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология»). Полиморфизмы оценивали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) согласно методике производителя тест-систем (ООО «НПО ДНК-Технология»). ПЦР-РВ проводили на амплификаторе ДТ-384 производства ООО «НПО ДНК-Технология». Изучавшиеся полиморфизмы представлены в табл. 1.

Исходя из данных литературы, у каждого из представленных полиморфизмов есть аллель кардиориска и аллель кардиопротекции. Аллелью кардиориска принято называть аллель, при которой повышен риск возникновения ССЗ, согласно данным литературы. В свою очередь, аллель кардиопротекции, та при которой риск возникновения ССЗ снижен [15].

Частоты аллелей и генотипов определялись исходя из закона Харди—Вайнберга [17]. Для проверки соответствия эмпирического распределения частот генотипов теоретически ожидаемому равновесному распределению использовался z-критерий биномиального распределения. Достоверными считали различия частот аллелей и генотипов при значении критерия меньше либо равным 0,05 [3, 12]. В качестве популяционных данных (группа контроля) использовались общедоступные базы данных [10].

Полиморфизмы изучаемые в работе, разбитые по группам

Таблица 1

Группа полиморфизмов	Полиморфизмы	Аллель кардиориска
Группа ренин-ангиотензиновой системы	1) rs4340 (I/D, ген <i>ACE</i> )	D
	2) rs699 (Met235Thr (704T>C), ген <i>AGT</i> )	C
	3) rs4762 (Thr174Met (521 C>T), ген <i>AGT</i> )	T
	4) rs5186 (1166 A>C, ген <i>AGTR1</i> )	C
	5) rs1403543 (G1675A, ген <i>AGTR2</i> )	A
Система регуляции давления в кровяном русле	1) rs1799722 (-58T/C (+9/-9), ген <i>BDKRB2</i> )	C
	2) rs1799983 (894G>T (Glu298Asp), ген <i>NOS3</i> )	T
Группа напрямую или опосредованно связанная с вторичными мессенджерами	1) rs5443 (825C>T, ген <i>GNB3</i> )	T
	2) rs17602729 (34C/T, ген <i>AMPD1</i> )	C
Группа компонентов системы свертывания крови	1) rs5918 (1565 T>C, ген <i>ITGB3</i> )	C
Группа факторов пролиферации	1) rs2016520 (294 T>C, ген <i>PPARD</i> )	C
Группа рецепторов вегетативной нервной системы	1) rs1042714 (79C>G (Gln27Glu), ген <i>ADRB2</i> )	G

Распределения частот кардиориска для группы контроля, группы скоростно-силовых видов спорта и группы циклических видов спорта (р — аллель кардиориска; q — аллель кардиопротекции)

Ген	Популяция		Циклические виды спорта		Скоростно-силовые виды спорта	
	р	q	р	q	р	q
<i>ACE</i>	0,50	0,50	0,51	0,49	0,52	0,49
<i>AGT</i>	0,41	0,59	0,52	0,48	0,54	0,46
<i>AGT(2)</i>	0,11	0,89	0,15	0,85	0,19	0,81
<i>AGTR1</i>	0,64	0,36	0,72	0,22	0,78	0,28
<i>AGTR2</i>	0,60	0,40	0,5	0,5	0,55	0,45
<i>BDKRB2</i>	0,46	0,54	0,46	0,54	0,48	0,52
<i>GNB3</i>	0,39	0,61	0,28	0,72	0,42	0,58
<i>NOS3</i>	0,34	0,66	0,3	0,69	0,41	0,59
<i>ITGB3</i>	0,14	0,86	0,13	0,87	0,19	0,81
<i>ADRB2</i>	0,47	0,53	0,43	0,57	0,49	0,51
<i>PRARD</i>	0,22	0,78	0,12	0,88	0,23	0,77
<i>AMPD1</i>	0,13	0,87	0,13	0,87	0,21	0,79

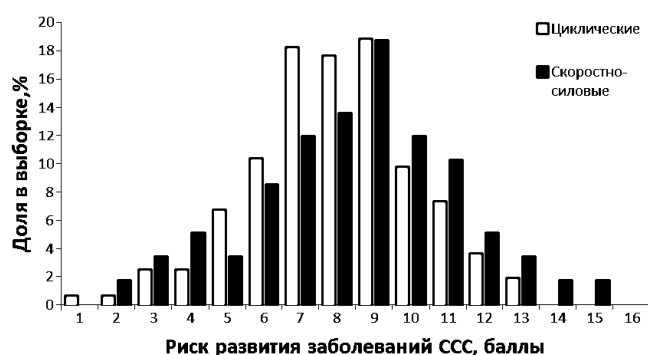
### Результаты и обсуждение

Для обеих групп спортсменов был проведен генетический анализ по 12 полиморфизмам (*ACE*, *AGT*, *AGTR1*, *AGTR2*, *BDKRB2*, *GNB3*, *NOS3*, *ITGB3*, *ADRB2*, *PRARD*, *AMPD1*). Проведено сравнение частот встречаемости данных полиморфизмов в группе контроля и двух изучаемых группах. Частоты аллелей соответствуют распределению Харди—Вайнберга, что позволяет составить распределения частот кардиориска для группы контроля и двух групп спортсменов (табл. 2), на котором можно визуальным образом проследить различия в частотах между разными группами.

Анализ распределения частот аллелей показал, что в группе циклических видов спорта значимые различия относительно группы контроля наблюдаются по полиморфизмам генов *AGT*, *AGTR1*, *AGTR2*, *NOS3* и *PRARD*, тогда как в группе скоростно-силовой подготовки значимые различия, также относительно группы контроля отмечаются по следующим генам: *AGT*, *AGTR1*, *GNB3*, *NOS3*, *ITGB3*, *AMPD1*.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что значения частот аллелей кардиориска значимо выше у профессиональных спортсменов по сравнению с группой контроля, что соответствует литературным данным [1, 2, 4, 12]. Наиболее демонстративным являются различия в частотах аллеля С, полиморфизма rs699 гена *AGT*. Аллель С данного полиморфизма у группы спортсменов циклической и скоростно-силовой подготовки значимо превышают популяционные данные ( $p=0,11$ ;  $0,15$ ;  $0,19$  соответственно), что свидетельствует о повышенной риске возникновения ССЗ у обеих групп, при чем у группы скоростно-силовой подготовки этот риск заметно выше чем у циклической группы. Сходное распределение можно на-

блюдать на примере гена *AGTR1*(rs5186): частота распределения аллеля С ( $p=0,64$ ;  $0,72$ ;  $0,78$ ) соответственно для группы контроля, циклической и скоростно-силовой. Что свидетельствует о тенденции к повышенному кардиориску у обеих групп спортсменов, и так же как у полиморфизма *AGT*, данный риск выше у группы скоростно-силовой подготовки. Также стоит отметить распределение по полиморфизму rs1799983 гена *NOS3*, частоты аллеля Т равны  $p=0,34$ ;  $0,30$ ;  $0,41$  соответственно для группы контроля, циклической и скоростно-силовой. Для данного полиморфизма тенденция несколько иная, частота аллели Т у группы скоростно-силовой подготовки так же значимо превышает популяционные данные и свидетельствует о повышенном риске возникновения патологий ССС, тогда как частота аллеля у группы циклической подготовки значимо меньше популяционных данных, что указывает на снижение кардиориска у данной группы по данному полиморфизму.



Суммированные данные оценки кардиориска для двух групп спортсменов



## Методика оценки индивидуального кардиориска

В ходе данного исследования была разработана методика индивидуальной оценки кардиориска. Каждому определённому состоянию полиморфизма присваивался свой бал: гетерозиготе 1 балл, гомозиготе по аллели кардиориска 2 балла, гомозиготе по аллели кардиопротекции 0 баллов. Баллы по всем 12 полиморфизмам суммировались, в итоге сумма теоретически могла иметь разброс от 0 до 24 баллов. Результаты были разбиты на 4 группы: 0—6 баллов — низкий кардиориск, 7—12 — умеренный кардиориск, 13—18 баллов — повышенный кардиориск, 19—24 — высокий кардиориск. Для каждого спортсмена была составлена таблица с индивидуальным подсчетом его кардиориска.

Для оценки кардиориска внутри групп циклической и скоростно-силовой подготовки был построен график (рисунок), на котором отражающий распределение риска развития сердечно-сосудистых заболеваний внутри группы в процентном соотношении. По результатам обсчета данных о суммарном кардиориске, представленным на графике, возможно сделать ряд утверждений. Во-первых, это преобладание у группы циклических видов спорта низкого и умеренного кардиориска (6—10 баллов), тогда как при крайних значениях умеренного и повышенном кардиориске преобладает группа скоростно-силовой подготовки (9—16 баллов). Из таких показателей можно сделать предположение, что риск возникновению патологии ССС у группы скоростно-силовой подготовки значимо выше, чем у групп циклической подготовки.

## Заключение

Таким образом, по результатам данной работы можно сделать выводы, что предрасположенность к развитию нарушений ССС у спортсменов как циклических, так и скоростно-силовых видов спорта составляет выше среднепопуляционных. В свою очередь, у группы скоростно-силовой подготовки риск возникновения ССЗ значимо выше, чем у группы циклической подготовки. Также следует отметить, что разработанный и применённый в данном исследовании комплексный подход к оценке риска ССЗ дает возможность наиболее полно оценивать вклад аллельных вариантов различных генов в возникновение ССЗ. Данная методика открывает путь к построению генных сетей развития мультифакториальных заболеваний. Дальнейший поиск внедрение генетических маркеров мультифакториальных заболеваний будет иметь не только научное, но и социально-экономическое значение, так как позволит повысить надежность и эффективность ранней скрининговой диагностики данных патологий.

## Сведения об авторах:

Шкурников Максим Юрьевич, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. молекулярной физиологии ФГБУ «НИИОПП» РАМН  
Максименко Даниил Геннадьевич, мл. науч. сотр. ООО НТЦ «БиоКлиникум»

## Список литературы

1. Ахметов И.И., Астратенкова И.В., Rogozkin В.А. Ассоциация полиморфизма гена PPAR $\delta$  с физической деятельностью человека // Молекулярная биология. — 2007. — Т. 41, №5. — С. 852—857.
2. Alvarez R., Terrados N., Ortolano R. et al. Genetic variation in the renin-angiotensin system and athletic performance // Appl. Physiol. — 2000. — May. — 82(1—2). — P. 117—120.
3. Agresti A. An introduction to categorical data analysis. — «John Wiley & Sons Inc.», Hoboken, New Jersey, 2007.
4. Ahmetov I.I., Mozhayanskaya I.A., Flavell D.M. et al. PPAR $\alpha$  gene variation and physical performance in Russian athletes // Eur. J. Appl. Physiol. — 2006. — Vol. 97 (1). — P. 103—108
5. Ahmetov I.I., Rogozkin V.A. Genes, athlete status and training — An overview // Genetics and Sports / Ed. by Collins M. Basel. — Karger, 2009.
6. Ballesteros F., Tassies D., Reverter J.C. et al. Idiopathic Sudden Sensorineural Hearing Loss: Classic Cardiovascular and New Genetic Risk Factors // Audiol. Neurootol. — 2012. — Aug. 30. — Vol. 17(6). — 400—408.
7. Barish G.D., Narkar V.A., Evans R.M. PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome // J. Clin. Invest. — 2006. — Vol. 116(3). — P. 590—597.
8. Bonnardeaux A., Davies E., Jeunemaitre X. et al. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension // Hypertension. — 1994. — Jul. — Vol. 24(1). — P. 63—69.
9. Eynon N., Meckel Y., Alves A.J. Is there an interaction between PPAR $\delta$  T294C and PPAR $\gamma$  C1A Gly482Ser polymorphisms and human endurance performance? // M. Exp. Physiol. — 2009. — Nov. — Vol. 94(11). — P. 1147—1152.
10. <http://www.nextbio.com/b/nextbio.nb>
11. Jones A., Dhamrait S.S., Payne J.R. Genetic variants of angiotensin II receptors and cardiovascular risk in hypertension // Hypertension. — 2003. — Oct. — Vol. 42(4). — P. 500—506. Epub. 2003 Aug. 18.
12. Kanji K. 100 Statistical Tests, «SAGE Publications Ltd». — London, 2006.
13. Lee J.Y. et al. GNB3 C825T polymorphism and elevated blood pressure // Int. J. Sports Med. — 2009. — Dec. — Vol. 30(12). — P. 892—897.
14. Li Y.Y. et al. Bradykinin  $\beta$ (2) Receptor -58T/C Gene Polymorphism and Essential Hypertension: A Meta-Analysis // PLoS One. — 2012. — Vol. 7(8). — e43068.
15. Montgomery H., Clarkson P., Dollery C.M. et al. Association of angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism with change in left ventricular mass in response to physical training // Circulation. — 1997. — Vol. 96. — P. 741—747.
16. Priori S.G., Aliot E., Blomstrom-Lindqvist L. et al. Task force on sudden cardiac death of the European Society of Cardiology // Eur. Heart J. — 2001. — Vol. 22. — P. 1374—1450.
17. Siffert W. Review G protein beta 3 subunit 825T allele, hypertension, obesity, and diabetic nephropathy // Nephrol. Dial. Transplant. — 2000. — Sep. — Vol. 15(9). — P. 1298—1306.
18. Thomsen M., Dahl M., Tybjaerg-Hansen A., Nordestgaard B.G.  $\beta$ 2-adrenergic receptor Thr164Ile polymorphism, blood pressure and ischaemic heart disease in 66750 individuals // J. Intern. Med. — 2012. — Mar. — Vol. 271(3). — P. 305—314.
19. Wolfarth B. et al. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2004 update // Med. Sci. Sports Exerc. — 2005. — Vol. 37(6). — P. 881—903. Review.
20. Zhang X. et al. Pharmacogenetic association of NOS3 variants with cardiovascular disease in patients with hypertension: the GenHAT study. // PLoS One. — 2012. — Vol. 7(3). — e34217.

Поступила 28.09.12

С.А. Мензиков, М.Н. Карпова, М.В. Калинина

## Активность $Cl^-$ , $HCO_3^-$ -активируемой $Mg^{2+}$ -АТФазы, сопряженной с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами нейрональных мембран мозга крыс, в присутствии пентилентетразола в экспериментах *in vitro* и *in vivo*

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

В экспериментах *in vitro* установлено, что ГАМК (0,1 мкМ) активировал  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ -АТФазу нейрональных мембран, а в присутствии 20 мкМ пентилентетразола (ПТЗ) эффект медиатора на фермент не проявлялся. ПТЗ (15–25 мкМ) в тех же условиях опыта увеличивал активность «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы и ингибировал активирующий эффект ионов  $Cl^-$ + $HCO_3^-$  на фермент. Аналогичный эффект ПТЗ на активность «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы и ее активацию анионами наблюдался и при внутрибрюшинном его введении животным в дозе 65 мг/кг (*in vivo*). Показано, что в диапазоне концентраций субстрата  $Mg^{2+}$ -АТФ (0,5–2,5 мМ) в среде инкубации, ПТЗ активировал «базальную»  $Mg^{2+}$ -АТФазу и полностью ингибировал активирующий эффект анионов на фермент по сравнению с контролем. Делается заключение о вовлечении сопряженной с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ -АТФазы нейрональных мембран в синаптическую передачу в ЦНС и в патогенез ПТЗ-индуцируемой судорожной активности мозга животных.

**Ключевые слова:** пентилентетразол, плазматические мембраны мозга крыс,  $Mg^{2+}$ -АТФаза, хлор, бикарбонат

S.A. Menzikov, M.N. Karpova, M.V. Kalinina

## The activity of the $Cl^-$ , $HCO_3^-$ -activated $Mg^{2+}$ -ATPase coupled with GABA<sub>A</sub>-receptor of the neuronal membrane from rat brain in the presence pentylentetrazole both *in vitro* and *in vivo* experiences

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

It was found *in vitro* experience that GABA (0,1 μM) activated  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$  ATPase neuronal membrane and in the presence 20 μM of the pentylentetrazole (PTZ) the effect of the neurotransmitter on the enzyme did not appear. The pentylentetrazole in range concentrations 15–25 M enhances the activity of the «basal»  $Mg^{2+}$ -ATPase and eliminated the activating effect of  $Cl^-$ + $HCO_3^-$  on the enzyme was found. Similar the effect of the PTZ on the activity of the «basal»  $Mg^{2+}$ -ATPase activity and it is activating by anions it was observed under intraperitoneal injection of the it at dose 65 mg/kg. In particular, it was found that in the range concentration of the substrate  $Mg^{2+}$ -ATP (0,5–2,5 mM) in the incubation medium the PTZ activated the «basal»  $Mg^{2+}$ -ATPase and fully eliminates the activating effect of the anions on the enzyme. It was conclusion about involved of the coupled with GABA<sub>A</sub>-receptor  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ -activated  $Mg^{2+}$ -ATPase of the neuronal membrane under synaptic transmission of the CNS and pathogenesis of the PTZ-induced convulsions of the animal.

**Key words:** pentylentetrazole, plasma membranes from brain of rat,  $Mg^{2+}$ -ATPase, chloride, bicarbonate

$Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ -активируемая  $Mg^{2+}$ -АТФаза плазматических мембран сопряжена с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами нейронов мозга животных и вовлечена в АТФ-зависимый транспорт ионов  $Cl^-$  через мембрану нейронов [3]. Активность сопряженной с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ -АТФазы состоит из активности «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы, активи-

руемой ионами хлора и бикарбоната. Было установлено, что вектор направления (в клетку или из клетки) транспорта  $Cl^-$  и активность фермента регулируются ионами  $HCO_3^-$  [4], а также активаторами и блокаторами тормозных рецепторов. В частности, было показано, что ГАМК изменяет активность фермента, а пикротоксин — специфический блокатор ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов, устраняет эффект медиатора [6]. Кроме того, нами было показано, что при действии конвульсанта пикротоксина в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, в плазматических мембранах мозга

Для корреспонденции: Карпова Маргарита Николаевна, д-р биол. наук, зав. лаб. эпилептогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: niio@pp@mail.ru

крыс ингибировалась активность сопряженного с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами фермента, что проявлялось в увеличении активности «базальной» Mg<sup>2+</sup>-АТФазы и в ингибировании ее активации ионами Cl<sup>-</sup> и Cl<sup>-</sup>+HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> [5]. В то же время, активация фермента ионами HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> оставалась без изменения. В связи с этим представлялось целесообразным выяснить, будут ли происходить аналогичные изменения активности Cl<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-АТФазы, сопряженной с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами, при действии ГАМК и другого конвульсанта — пентилентетразола (ПТЗ) в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

### Методика

Работу проводили на 30 крысах самцах линии Вистар массой 160—170 г. Животных содержали в обычных условиях вивария на стандартном пищевом рационе. В постановке эксперимента руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» ФГБУ «НИИОПП» РАМН, которые соответствуют требованиям Всемирного общества защиты животных (WSPA) и европейской конвенции по защите экспериментальных животных.

Для получения фракции микросом, обогащенной плазматическими мембранами, животных декапитировали, извлекали кору мозга, гомогенизировали при 4°C в соотношении 1:8 в 10 мМ Hepes-Tris буфере, рН 7.2, содержащем 0,125 мМ ЭДТА, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид, центрифугировали на ультрацентрифуге Beckman (США) в бакет-роторе (SW-28) при 10 000 г в течение 20 мин при 4°C. Полученный супернатант центрифугировали при 100 000 г в течение 1 ч при 4°C. Полученную в осадке микросомальную фракцию суспендировали 10 мМ Hepes-Tris буфером, рН 7.2 и использовали для определения АТФазной активности [6].

### Эксперименты *in vitro*

Для определения активности фермента микросомальный препарат (~20 мкг) вносили в 0,5 мл среды инкубации, содержащей 10 мМ Hepes-Tris буфер, рН 7.3, 1,0 мМ MgSO<sub>4</sub>, 1,0 мМ Tris-АТФ, 40 мМ NaCl + 8 мМ NaHCO<sub>3</sub>, а при исследовании влияния ГАМК (0,1 мкМ) и ПТЗ (20 мкМ) лиганды преинкубировали с белком в течение 15 мин при 30°C. Удельную АТФазную активность оценивали по приросту неорганического фосфора (Ф<sub>i</sub>) в 0,5 мл инкубационной среды при 30°C в течение 30 мин, оставив добавление в среду инкубации 1,8 мл 30%-ной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, определяли содержание фосфора в пробах методом Чена и выражали в мкмоль Ф<sub>i</sub>/ч на 1 мг белка [6].

### Эксперименты *in vivo*

Острые генерализованные судороги у крыс вызывали внутрибрюшинным введением ПТЗ в дозе 65 мг/кг. Опытных животных декапитировали сразу после появления судорог тяжестью 4—5 баллов, т.е. на пике судорожной активности [2]. Контрольных животных декапитировали в те же временные сроки (2—5 мин) после введения физиологического раствора. Мозг быстро извлекали и отмывали охлажденным 10 мМ Hepes-tris буфером (рН 7,4), содержащим 0,125 мМ ЭДТА. Фракцию плазматических мембран из мозга контрольных и опытных животных получали по стандартной методике, описанной выше.

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием стандартного пакета программ Statistica for Windows по общеизвестным методам вариационной статистики с оценкой значимости показателей и различий рассматриваемых выборок по t-критерию Стьюдента. Числовые данные представлены как среднее значение (M) ± стандартная ошибка (m). Статистически значимыми считали различия между группами при p<0,05.

### Результаты и обсуждение

Результаты проведенного исследования *in vitro* показали, что активность «базальной» Mg<sup>2+</sup>-АТФазы плазматических мембран мозга крыс составила 6,8 мкмоль Ф<sub>i</sub>/ч на 1 мг белка (табл. 1). В присутствии ионов Cl<sup>-</sup> + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> активность фермента увеличилась на 34% (p<0,05).

Ранее нами было показано, что активность Cl<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-АТФазы нейрональных мембран регулируется ГАМК<sub>A</sub>-ергическими лигандами [6]. Рецептор-зависимое аллостерическое действие ГАМК<sub>A</sub>-лигандов на фермент может иметь в зависимости от условий среды инкубации и преинкубации разнонаправленный характер, что проявляется в активировании или ингибировании активности «базальной» Mg<sup>2+</sup>-АТФазы и как следствие в изменении ее активации анионами. В данной работе мы исследовали влияние ГАМК и ПТЗ на активность фермента. Из представленных данных видно, что в присутствии 0,1 мкМ ГАМК активность «базальной» Mg<sup>2+</sup>-АТФазы увеличилась на 29%, а активирующий эффект ионов Cl<sup>-</sup>+HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> не проявился. ПТЗ в концентрации 20 мкМ устранял действие медиатора на активность фермента. Для выяснения специфичности влияния ПТЗ на «базальную» Mg<sup>2+</sup>-АТФазную активность исследовали его действие на активирующий эффект анионов на фермент. Установлено, что после преинкубации микросом с конвульсантом активность «базальной» Mg<sup>2+</sup>-АТФазы увеличилась на 25% (p<0,05) и составила 8,5 мкмоль Ф<sub>i</sub>/ч на 1 мг белка. В присутствии только ПТЗ акти-

Влияние анионов на «базальную»  $Mg^{2+}$ -АТФазную активность в отсутствие и в присутствии 0,1 мкМ ГАМК, 20 мкМ ПТЗ и 0,1 мкМ ГАМК + 20 мкМ ПТЗ

Вносимый лиганд, мкМ	«Базальная» $Mg^{2+}$ -АТФазная активность, мкмоль $\Phi_i$ /ч на 1 мг белка	
	В отсутствие анионов	40 мМ $Cl^-$ + 8 мМ $HCO_3^-$
Контроль	6,8±0,5	9,1±0,6*
ГАМК (0,1 мкМ)	8,8±0,4*	8,7±0,2
ПТЗ (20 мкМ)	8,5±0,7*	8,3±0,5
ГАМК 0,1 мкМ + ПТЗ 20 мкМ	7,2±0,5	9,4±0,8

Примечание. \* —  $p < 0,05$  достоверные отличия от значений активности фермента в контроле

Влияние ПТЗ на активирующий эффект ионов 40 мМ  $Cl^-$  + 8 мМ  $HCO_3^-$  на «базальную»  $Mg^{2+}$ -АТФазную активность плазматических мембран мозга крыс

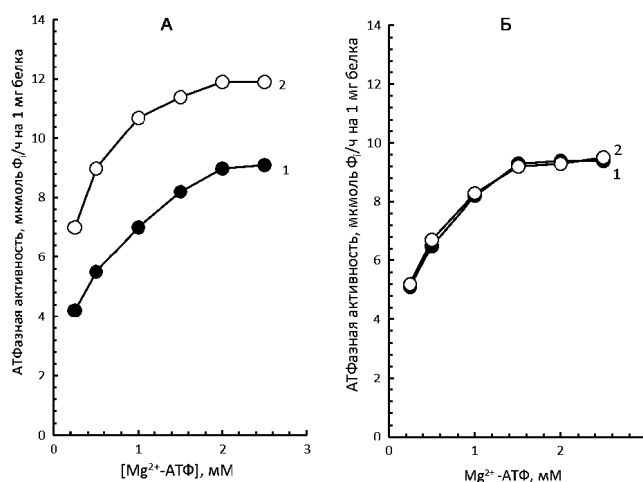
Пентилентетразол, мкМ	$Cl^-$ , $HCO_3^-$ -АТФазная активность, мкмоль $\Phi_i$ /ч на 1 мг белка
—	3,5±0,2
2,5	2,8±0,3
5,0	1,9±0,2
10	0,8±0,1
15	0
25	0

вирующий эффект ионов  $Cl^- + HCO_3^-$  на «базальную»  $Mg^{2+}$ -АТФазу также не проявлялся. Таким образом, в присутствии анионов как ГАМК, так и ПТЗ проявляли свойства ингибитора и подавляли их активирующий эффект на фермент, что может свидетельствовать о принадлежности исследуемых АТФазных активностей одному ферменту. Поэтому, если в присутствии активатора или блокатора активность «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы достигает максимальных значений, то, вследствие наличия у нее конечного максимального значения молекулярной активности (числа оборотов), дополнительной активации фермента анионами не происходит.

Следующим этапом работы было исследование различных концентраций ПТЗ на активность  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ -АТФазы нейронов мозга. Как видно из табл. 2, ПТЗ вызывает эффект ингибирования начиная с концентрации 2,5 мкМ, а в диапазоне концентраций 15—25 мкМ на 100% подавляет ферментативную активность.

Поскольку результаты, полученные в экспериментах *in vitro*, показали высокую чувствительность исследуемого фермента к ПТЗ, представлялось важным исследовать влияние конвульсанта в условиях *in vivo*. Установлено, что по сравнению с контролем у опытных животных на пике судорожной реакции в исследуемом диапазоне концентраций  $Mg^{2+}$ -АТФ (0,25—2,5 мМ) наблюдалось увеличение на ~20% ( $p < 0,05$ ) активности «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы плазматических мембран, но при

этом не происходила ее активация при концентрациях 40 мМ  $Cl^- + 8$  мМ  $HCO_3^-$  (рисунок). Таким образом, полученные результаты показали, что характер изменения активности фермента, в отсутствие и в присутствии анионов при ПТЗ-индуцируемой судорожной активности у крыс аналогичен изменениям



Активность «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы плазматических мембран мозга крыс при различных концентрациях  $Mg^{2+}$ -АТФ в среде инкубации в отсутствие (1) и в присутствии (2) ионов  $Cl^- + HCO_3^-$ :

А — в контроле; Б — на пике судорожной активности.

По оси абсцисс — концентрация  $Mg$ -АТФ, мМ; по оси ординат — активность «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы в отсутствие (1) и в присутствии (2) ионов  $Cl^- + HCO_3^-$ , мкмоль  $\Phi_i$ /ч на 1 мг белка

активности фермента в экспериментах *in vitro*. Кроме того, эти результаты согласуются с нашими [5] и литературными данными [8], полученными при исследовании влияния на активность «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы плазматических мембран другого конвульсанта, пикротоксина. Так, в условиях пикротоксин-индуцируемой судорожной активности происходило увеличение активности «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы на ~60—80% [5, 8]. Кроме того, наши результаты совпадают с данными, полученными электрофизиологическими и биохимическими исследованиями влияния ПТЗ на функцию ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов. Так, в электрофизиологическом исследовании рекомбинантных ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов было показано, что  $Cl^-$ -ток, индуцируемый 10 мкМ ГАМК ингибировался ПТЗ с  $I_{50}=0,62$  мМ [12]. В биохимических исследованиях также было установлено, что ПТЗ ингибирует ГАМК<sub>A</sub>-индуцируемый транспорт  $^{36}Cl$  в синаптической нейросоме из мозга крыс начиная с концентрации 1 мМ [2, 7]. В то же время, было показано, что ПТЗ незначительно уменьшает эффект связывания [ $^3H$ ]ГАМК или [ $^3H$ ]мусцимола гомогенатами из различных областей мозга крыс [13, 16]. В нашем исследовании ГАМК (10 мкМ) изменяет активность фермента, а ПТЗ устраняет эффект медиатора и в концентрационно-зависимой манере ингибирует его, что указывает на рецептор-зависимый путь их действия. Кроме того, ранее нами было установлено, что изучаемая АТФаза нейронов является полифункциональной аллостерической структурой, со свойствами фермента,  $Cl^-$ -насоса и лиганд-управляемого  $Cl^-$ -канала [3]. Преинкубация таких аллостерических белков с лигандами различной природы, увеличивает их чувствительность к последним. В нашем исследовании более высокая чувствительность фермента к ПТЗ также связана с аллостерическими свойствами исследуемого фермента.

Патогенез эпилепсии может быть связан не только с изменением в функциональной активности тормозных рецепторов [9], но и с нарушением энергетических процессов в нейрональных клетках [1]. Так, при ПТЗ-индуцируемой эпилепсии наблюдается изменение механизмов свободно-радикального перекисного окисления липидов [10] и митохондриальная дисфункция [15]. Результатом митохондриальной энцефалопатии является избирательное, в зависимости от слоя мозга, уменьшение концентрации глюкозы, АТФ и креатинфосфата [14]. Также было показано, что ПТЗ, связываясь на внешней стороне плазматических мембран, влиял на функциональную активность ионных каналов [11], транспортных АТФаз Р-типа, а также «общей» или так называемой «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы нейрональных клеток моз-

га животных [10]. Так, было установлено, что при введении крысам ПТЗ в дозе 40 мг/кг наблюдается увеличение на ~20% «общей»  $Mg^{2+}$ -АТФазы плазматических мембран мозга [10]. В нашем исследовании в экспериментах *in vitro* и *in vivo* также происходит увеличение на 20—25% активности «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы и снижение ее активации анионами, что, вероятно, в какой-то степени также связано с нарушением процессов перекисного окисления липидов. Однако, исходя из ранее полученных данных по влиянию ГАМК<sub>A</sub>-ергических лигандов на активность фермента [6], можно предположить, что основной эффект ПТЗ на фермент связан с прямым взаимодействием конвульсанта с молекулой белка и изменением ее конформации и, как следствие, гидролитических свойств.

Результаты проведенного нами исследования показали высокую чувствительность изучаемой  $Cl^-/HCO_3^-$ -активируемой  $Mg^{2+}$ -АТФазы нейрональных мембран мозга крыс к ПТЗ. Хотя этот конвульсант давно применяется в научных экспериментах, механизм его действия до конца не изучен. Однако было показано, что ПТЗ, через аллостерическое взаимодействие с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами, конкурентно изменяет конформацию  $Cl^-$ -канала и снижает вход ионов  $Cl^-$  в нейрон [9, 12]. Блокирование активности тормозных рецепторов, в свою очередь, приводит к доминированию функции возбуждающих рецепторов и, как следствие, к возникновению эпилептической активности [9]. Структурная и функциональная сопряженность исследуемой АТФазы с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами и изменение ее функциональной активности при действии ПТЗ как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*, подтверждают ранее высказанное предположение об участии фермента в ГАМК<sub>A</sub>-управляемых  $Cl^-/HCO_3^-$ -обменных процессах через мембраны нейронов и его вовлечение в патологию ПТЗ-индуцируемой судорожной активности.

### Список литературы

1. Ашмарин И.П., Стукалов П.В., Ещенко и др. Биохимия мозга. — СПб.: С.-Петербургский университет, 1999. — 328 с.
2. Карпова М.Н., Ребров И.Г. Изменения функционального состояния ГАМК<sub>A</sub>-рецепторного комплекса при экспериментальной эпилептизации мозга // Дизрегуляторная патология. — М.: Медицина, 2002. — С. 596—603.
3. Мензиков С.А., Карпова М.Н.  $Cl^-$ -транспортные механизмы в нейрональных мембранах и роль АТФ в их функционировании // Патогенез. — 2011, №1. — С. 4—10.
4. Мензиков С.А., Карпова М.Н., Калинина М.В. Влияние ионов  $HCO_3^-$  на АТФ-зависимый сопряженный с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами  $Cl^-$ -насос плазматических мембран мозга крыс // Бюл. экспер. биол. и мед. — 2011. — Т. 152, №7. — С. 43—47.

5. **Мензиков С.А., Карпова М.Н., Калинина М.В.** Влияние пикротоксина на ГАМК<sub>A</sub>-сопряженную Cl<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-активируемую Mg<sup>2+</sup>-АТФазную активность плазматических мембран мозга крыс в экспериментах *in vitro* и *in vivo* // Патогенез. — 2011. — №1. — С. 31–34.
6. **Мензиков С.А., Мензикова О.В.** Сравнительные свойства чувствительной к ГАМК<sub>A</sub>-ергическим лигандам Cl<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-активируемой Mg<sup>2+</sup>-АТФазы плазматических мембран мозга рыб и крыс // Ж. эвол. биохим. и физиол. — 2007. — Т. 43, №3. — С. 246–253.
7. **Ребров И.Г., Карпова М.Н., Андреев А.А.** и др. Влияние классических конвульсантов на Cl<sup>-</sup>-проводимость ГАМК<sub>A</sub>-рецепторного комплекса мембран клеток коры головного мозга животных на ранней стадии киндинга // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 2007. — Т. 143, №1. — С. 17–19.
8. **Толстухина Т.И., Флеров М.А.** АТФазная активность в нейронах и нейроглии при судорогах, вызванных пикротоксином // Вопросы медицинской химии. — 1999. — №2. — С. 1–3.
9. **Alvarez-Leefmans F.J., Delpire E.** Physiology and pathology of chloride transporters and channels in the nervous system: From molecules to diseases. — Publisher: Academic Press, 2009. — 500 p.
10. **Guzman D.C., Vazquez I.E., Mejia G.B.** et al. Effect of pentylentetrazole and carbodiimide on oxidation stress markers in rat brain // Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. — 2005. — Vol. 96. — P. 512–513.
11. **Hartung K., Hermann A.** Differential effects of pentylentetrazole on ion currents of Aplysia neurones // Brain Research. — 1987. — Vol. 419, №1–2. — P. 55–64.
12. **Huang R.-Q., Bell-Horner C.L., Dibas M.I.** et al. Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant  $\gamma$ -aminobutyric acid type A (GABA<sub>A</sub>) receptors mechanism and site of action // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 2001. — Vol. 298, №3. — P. 986–995.
13. **Ito M., Chiu T.H., Rosenberg H.C.** Effects of pentylentetrazol on GABA<sub>A</sub>/benzodiazepine/picrotoxinin receptor complexes in rat brain regions // Neurochem. Res. — 1986. — Vol. 11, №5. — P. 637–646.
14. **McCandless D.W., Dworsky S., Modak A.T.** et al. Pentylentetrazole-induced changes in cerebral energy metabolism in Tupai // Epilepsia. — 1987. — Vol. 28, №2. — P. 184–189.
15. **Patel M.** Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures // Free Radic. Biol. Med. — 2004. — Vol. 37, №12. — P. 1951–1962.
16. **Walsh L.A., Li M., Zhao T.J.** et al. Acute pentylentetrazol injection reduces rat GABA<sub>A</sub> receptor mRNA levels and GABA stimulation of benzodiazepine binding with no effect on benzodiazepine site density // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 1999. — Vol. 289, №3. — P. 1626–1633.

Поступила 26.03.12

#### Сведения об авторах:

Мензиков Сергей Арсентьевич, д-р биол. наук, вед. научн. сотр. лаб. эпилептогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Калинина Марина Васильевна, научн. сотр. лаб. эпилептогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН

В.И. Коненков, О.П. Макарова, Н.П. Бгатова

## **Роль лимфатического дренажа в изменении активности цитокинов и функций нейтрофилов в крови крыс после термического ожога кожи**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, 630117, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2

Проведено комплексное исследование активности цитокинов —  $IL-1\beta$ ,  $TNF\alpha$ ,  $IL-2$ ,  $IL-4$ , функций нейтрофилов в крови крыс Wistar в норме и в условиях нарушения лимфатического дренажа кожи после термического ожога кожи 3А степени (10% поверхности тела). Концентрацию цитокинов в сыворотке крови определяли методом проточной иммунофлуориметрии с использованием тест-системы «Bio-Rad» (США). Функциональное состояние нейтрофилов оценивали по способности к поглощению убитых *St. aureus* и по восстановлению биоцидности НСТ-тесте до и после стимуляции продигозаном или убитыми *St. aureus*. В течение 1-й недели на фоне нарушения дренажной функции лимфатического аппарата кожи в сыворотке крови было обнаружено торможение активности цитокинов —  $IL-1\beta$ ,  $IL-2$  и  $TNF\alpha$  и увеличение концентрации  $IL-4$  в 2,2 раза. Процент фагоцитирующих стафилококки нейтрофилов снижался в 1,4 раза. Повышенный окислительный метаболизм нейтрофилов наблюдали только на третьи сутки. В течение 2-й недели происходило восстановление фагоцитарной и снижение биоцидной функции нейтрофилов, что сочеталось со снижением способности этих клеток отвечать на стимуляцию как продигозаном, так и *St. aureus*. Повышение активности провоспалительных цитокинов  $IL-1\beta$ ,  $TNF\alpha$  наблюдали к 30-м суткам. Таким образом, выделено двухфазное изменение активности цитокинов с различной биологической активностью и функций нейтрофилов, связанное с состоянием лимфатического дренажа.

**Ключевые слова:** ожог кожи, лимфатический дренаж, цитокины, нейтрофилы, НСТ-тест, фагоцитоз

V.I. Konenkov, O.P. Makarova, N.P. Bgatova

## **Role of the lymphatic drainage in change of cytokine activity of and neutrophil functions in rats after thermal skin burn**

Institute of clinical and experimental lymphology Siberian Branch RAMS, 2, Timakova str., Novosibirsk, 630117

Simultaneous complex investigation of cytokine activity —  $IL-1\beta$ ,  $TNF\alpha$ ,  $IL-2$ ,  $IL-4$  and neutrophil functions in Wistar rat blood in norm and in dysfunction of lymphatic drainage after thermal skin burn 3A degree (10% of a body surface) has been performed. Blood serum cytokine levels were detected by flowing immunofluorescence method with using «Bio-Rad» test-system (USA). Neutrophil functions were estimated on ability to phagocytize heat-killed *St. aureus* and on spontaneous and stimulated (prodigiosan, heat-killed *St. aureus*) NBT reduction. Inhibition of the rise of  $IL-1\beta$ ,  $IL-2$  and  $TNF\alpha$  activity and the increase of the  $IL-4$  values in 2 times were found in the systemic circulation at the first week during dysfunction of skin lymphatic drainage. Neutrophil phagocytic activity was decreased in 1,4 times at 3 and 7 days, but spontaneous ability to reduce NBT was increased only on 3 day. The neutrophil phagocytic activity was normalized at the second week, but ability of these cells to reduce NBT and to respond on stimulation by prodigiosan or heat-killed *St. aureus* were decreased. The proinflammatory cytokines  $IL-1\beta$ ,  $TNF\alpha$  levels were increased at 30 day. Thus, two-phase change of cytokine activities with different biological effects and blood neutrophil functional activity caused by lymphatic drainage state was found.

**Key words:** skin burn, lymphatic drainage, cytokines, neutrophils, NBT-test, phagocytic activity

Обширные термические ожоги кожи независимо от локализации сопровождаются воспалительной реакцией и выраженной наружной лимфореей (плазмореей), вследствие чего организм покидают жизненно

важные элементы — белки, электролиты и т.д. [8]. При расстройствах микроциркуляции, приводящих к массивному застою крови в сосудах, имеет место локальное компенсаторное увеличение лимфопродукции [1]. В этот период лимфатическое русло становится одним из главных дренажных звеньев интерстиция [23], поскольку накопление токсических продуктов и провоспалительных медиаторов в лимфе способно

Для корреспонденции: Бгатова Наталья Петровна, д-р биол. наук, проф., рук. лаб. ультраструктурных исследований ФГБУ «НИИКЭЛ» СО РАМН. E-mail: N\_Bgatova@ngs.ru

спровоцировать острый респираторный дистресс синдром, при котором погибает от 40 до 60% больных [21]. Модулируя дренажную функцию лимфатической системы путем наложения лигатуры на лимфатический проток удается значительно ослабить липополисахарид индуцированное повреждение легких [11, 12, 22], а также проявления геморрагического шока [24]. Перевязка лимфатического грудного протока при моделировании воспалительного процесса в кишечнике с помощью ишемии-реперфузии снижает уровни ИЛ-1 $\beta$  и повышает ИЛ-10 в сыворотке [10]. В основе патогенеза острого респираторного дистресс синдрома лежит повреждение аэро-гематического барьера в результате внутрисосудистой активации нейтрофилов [5]. Основная роль нейтрофилов в ожоговой ране сводится к активному удалению погибших клеток и защите от микробного заражения. На функциональное состояние нейтрофилов в крови, поврежденной коже, а также их готовность к реагированию на бактериальные стимулы, могут оказывать влияние как токсические агенты, так и продуценты активированных иммунных клеток — цитокины. Цитокины участвуют в формировании их функционального статуса [4] и в регулировании иммунного ответа, гемопоэза и воспаления [7]. Хотя современные методы лечения ожоговой травмы улучшили прогноз течения заболевания, частота осложнений и летальности остается высокой, в связи с чем идентификация механизмов, ответственных за послеожоговую иммунную дисфункцию, восприимчивость к раневой инфекции, развитию сепсиса и полиорганной недостаточности является крайне необходимой для усовершенствования способов лечения ожоговых больных. *Цель исследования* — изучение динамических изменений активности цитокинов — ИЛ-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , ИЛ-2, ИЛ-4 и функционального состояния нейтрофилов при нарушении лимфатического дренажа в области ожоговой раны.

### Методика

В эксперименте использовали 29 крыс-самцов Вистар массой 180—200 г. В соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» под эфирным наркозом крысам в груднопоясничной области наносили ожог диаметром 2 см путем подачи водяного пара в течение 5 с. У животных формировалась ожоговая рана кожи 3А степени, занимающая 10% поверхности тела. Контролем служили интактные животные. Состояние лимфатического дренажа кожи и развитие воспаления после ожога документировалось морфологически. Образцы кожи обрабатывали [17] для последующего электронно-микроскопического исследования. Полутонкие срезы толщиной 1 мкм окрашивали толуиди-

новым синим, затем под световым микроскопом выбирали необходимые участки тканей для исследования в электронном микроскопе JEM 1010. Концентрацию цитокинов — ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-4, TNF $\alpha$  в сыворотке крови определяли методом проточной иммунофлюориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческой тест-системы («Bio-Rad», США). Забор крови производили через 3, 7, 15 и 30 сут. после ожога. Для оценки степени эндогенной интоксикации использовали метод определения молекул средней массы (СМ) в сыворотке крови животных [2]. Кислородзависимую биоцидность нейтрофилов крови определяли в НСТ-тесте в спонтанном и индуцированном вариантах [6]. В качестве стимуляторов применяли продигозан — липополисахаридный комплекс, выделенный из непатогенного микроорганизма *Vac. Prodigiosum* («Мосхимфармпрепараты», Россия), и убитые бактерии *St. aureus* (Харьковское предприятие по производству бактериальных препаратов, Украина). Фагоцитарную активность нейтрофилов оценивали по способности поглощать убитые бактерии *St. Aureus* [6]. Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета статистических программ Statistica 6.0.

### Результаты и обсуждение

Лимфатические капилляры кожи в норме имели небольшие просветы, эндотелиоциты содержали умеренное количество органелл и мелких микропиноцитозных везикул, которые определялись как базальные, люминальные и цитоплазматические (рис. 1А). Контакты эндотелиоцитов имели характер интердигитаций, а также наложений типа «конец в конец». При термическом ожоге кожи лимфатические капилляры образовывали петли, их просветы были значительно расширены и заполнены электронноплотным содержимым (рис. 1Б). Выявлялись межэндотелиальные контакты открытого типа. Электронная плотность интерстиция была ниже плотности перикапиллярных пространств и просветов лимфатических капилляров, что, видимо, являлось отражением отека тканей и нарушения лимфатического дренажа. Интерстициальный отек приводил к сдавлению сосудов, что усугубляло нарушение лимфоциркуляции и кровотока, способствуя застою и тромбообразованию. В структуре фагоцитов отмечали значительное накопление лизосом (рис. 2).

Глубокое повреждение кожи после термического ожога приводило к инициации воспаления и к изменению продукции цитокинов, оказывающих плейотропные биологические эффекты на различные типы клеток и участвующих в формировании и регуляции



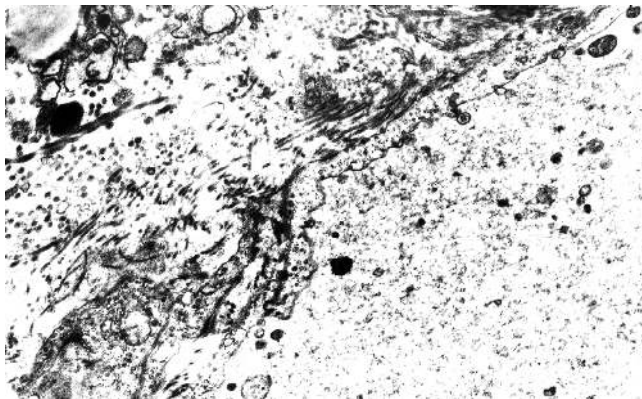


Рис. 1. Ультраструктурная организация эндотелиоцитов лимфатических капилляров кожи в норме и на третьи сутки после термического ожога:

А — лимфатический капилляр кожи интактного животного; Б — эндотелиоцит лимфатического капилляра кожи через 3 сут. после термического ожога. Ув.  $\times 8000$ .

защитных реакций организма. Динамика уровней IL-1 $\beta$  носила фазный характер. Концентрация IL-1 $\beta$  повышалась к 7-м сут. в 1,6 раза, к 15-м сут. возвращалась к исходной и затем снова повышалась в 2 раза к 30-м сут. (табл. 1). Аналогичной была динамика изменений концентрации IL-2. Высокий уровень положительной корреляционной зависимости между показателями активности IL-1 $\beta$  и IL-2 отмечали только на 15-е сут. ( $r=0,90$ ;  $p=0,04$ ; критерий Спирмэна). Через 1 нед. после ожога наблюдался рост активности IL-4 в 2,2 раза, по сравнению с контролем. При этом между показателями уровня концентраций IL-2 и IL-4 обнаруживалась высокая положительная взаимозависимость ( $r=0,90$ ;  $p=0,374$ ; критерий Спирмэна). Следует отметить, что уровни TNF $\alpha$  в сыворотке крови в течение 15 сут. после ожога кожи были значимо ниже контрольных. Обнаружено, что на третьи сутки показатели IL-1 $\beta$ /IL-4 возросли почти вдвое (табл. 2). Максимальные изменения в концентрациях циркулирующих в сыворотке цитокинов выявлены в конце 1-й нед. после ожога, предшествующей наиболее выраженным проявлениям воспаления. Именно в этот период отмечалось выраженное преобладание содержания в сыворотке IL-1 $\beta$ , IL-2 и TNF $\alpha$  над содержанием IL-4. В этот же период нарастало количество нейтрофилов, и повышалась их биоцидная активность. То есть имело место явное преобладание активности провоспалительных цитокинов. Резкое увеличение концентрации сывороточного IL-4 к концу 2-й нед. после ожога, вероятно, отражало переключение иммунного ответа к некротизированным тканям в очаге поражения на Th2 тип, что и приводило к ингибированию защитных функций нейтрофилов. Восстановление уровня

TNF $\alpha$  через 1 мес. после термической травмы способствовало стимуляции пролиферации фибробластов. Преобладание концентрации TNF $\alpha$  над уровнем сывороточного IL-4 с противовоспалительной активностью заметно уже на третьи сутки и сохраняется в течение всего месяца. Этот низкомолекулярный фактор является выраженным индуктором не только местного, но системного воспаления, вызывая увеличение синтеза IL-1 $\beta$ , усугубляющего повреждение тканей, тромбоз сосудов микроциркуляторного русла и задержку эвакуации тканевой жидкости в капиллярное русло [7].

После ожоговой травмы в крови повышались концентрации не только цитокинов и СМ-продуктов протеолиза, образующихся в поврежденных тканях, а также в самой плазме при выходе протеаз в кровь [3]. На 7-е сут. этот показатель возрос на 40% (табл. 3).

Накопление токсических продуктов и цитокинов сопровождалось изменением функционального состояния нейтрофилов. На 3-е и 7-е сут. фагоцитарная активность популяции нейтрофилов крови снижалась в 1,4 раза по сравнению с контролем (рис. 3), восстановление этой функции фагоцитов происходило к 15-е сут. Спонтанная биоцидная активность нейтрофилов в НСТ-тесте к 3-м суткам, напротив, увеличивалась вдвое, постепенно снижалась к 15-м сут. Реактивность нейтрофилов крови, оцениваемая в индуцированном НСТ-тесте по ответу на золотистый стафилококк или продигиозан, оставалась стабильной в течение недели после ожога, не отличаясь от контрольных показателей, и резко снижалась к 15-м сут. (рис. 3).

Анализ результатов показал, что при нарушении лимфатического дренажа в коже в ранний период развития воспаления после ожоговой травмы наблюдалась несостоятельность неспецифической рези-

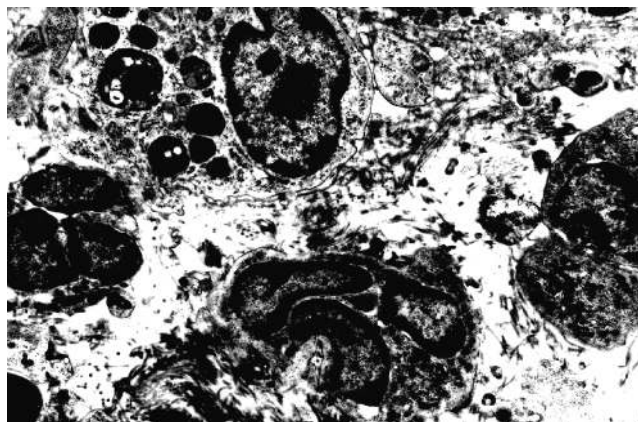


Рис. 2. Ультраструктура полиморфноядерных лейкоцитов, мигрировавших в кожу после термического ожога. Ув.  $\times 6000$

Таблица 1

Изменение концентрации цитокинов в сыворотке животных после термического повреждения кожи ( $M \pm m$ )

Группы животных	IL-1 $\beta$	IL-2	IL-4	TNF $\alpha$
Контроль (10)	1,66 $\pm$ 0,26	107,2 $\pm$ 14,85	6,83 $\pm$ 1,29	39,81 $\pm$ 0,59
3 сут. (5)	1,72 $\pm$ 0,35	87,36 $\pm$ 12,18	3,19 $\pm$ 0,74	37,66 $\pm$ 0,75*
7 сут. (5)	2,64 $\pm$ 0,44	150,4 $\pm$ 16,58	15,33 $\pm$ 8,79**	37,50 $\pm$ 0,63**+
15 сут. (5)	1,32 $\pm$ 0,27	78,87 $\pm$ 14,93	5,89 $\pm$ 3,25	37,61 $\pm$ 0,88*
30 сут. (4)	3,27 $\pm$ 0,65**	125,6 $\pm$ 23,75	4,56 $\pm$ 1,06	38,26 $\pm$ 0,65

Примечание. В скобках указано количество животных в группе; \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,001$  — по сравнению с контролем (критерий Фишера), + —  $p < 0,05$  — по сравнению с контролем (критерий Манна—Уитни)

Таблица 2

Изменение соотношения провоспалительных цитокинов и ИЛ-4 в сыворотке крови животных после термического ожога кожи ( $M \pm m$ )

Группы животных	IL-1 $\beta$ /IL-4	IL-2/IL-4	TNF $\alpha$ /IL-4
Контроль (10)	0,30 $\pm$ 0,05	19,5 $\pm$ 3,14	8,34 $\pm$ 1,75
3 сут. (5)	0,61 $\pm$ 0,12*	33,6 $\pm$ 7,96	15,1 $\pm$ 3,72
7 сут. (5)	0,85 $\pm$ 0,39	39,9 $\pm$ 15,06	12,32 $\pm$ 5,69
15 сут. (5)	0,38 $\pm$ 0,11	23,6 $\pm$ 6,54	12,88 $\pm$ 3,64
30 сут. (4)	1,21 $\pm$ 0,87	33,3 $\pm$ 9,57	10,2 $\pm$ 2,64

Примечание. В скобках указано количество животных в группе; \* —  $p < 0,05$  — по сравнению с контролем (критерий Манна—Уитни)

Таблица 3

Концентрация средних молекул (D254) в крови крыс с термическим повреждением кожи ( $M \pm m$ )

Группы животных	0 (5)	3 сут. (4)	7 сут. (5)	15 сут. (5)	30 сут. (4)
Контроль	0,24 $\pm$ 0,02				
Ожог		0,21 $\pm$ 0,004	0,34 $\pm$ 0,02**	0,21 $\pm$ 0,004	0,22 $\pm$ 0,004

Примечание. В скобках указано количество животных в группе; \*\* —  $p < 0,01$  по сравнению с контролем

стентности, что, по-видимому, приводило к присоединению инфекции и активации приобретенного иммунитета. В течение 7-х сут. наблюдалось снижение способности нейтрофилов к фагоцитозу, а активация окислительного метаболизма отмечалась только на третьи сутки. Ультраструктурное исследование нейтрофилов раневой поверхности кожи выявил признаки незавершенности фагоцитоза. В этот же период в крови возрастало содержание СМ, обладающих токсичностью. Под действием СМ могла снижаться фагоцитарная активность лейкоцитов [3]. Кроме того, в сыворотке крови было обнаружено отсутствие значимого роста активности IL-1 $\beta$ , IL-2 и TNF $\alpha$ , что могло также отчасти объясняться усилением протеолиза, который приводил к «слушиванию» рецепторов к этим цитокинам с поверхности клеток, их последующему связыванию с ними и инактивации [14]. Имеются данные, свидетельствующие о способности продуктов протеолиза — СМ подавлять индуцированную эндотоксином секрецию IL-1 $\beta$  [15] и TNF $\alpha$  [9] моноцитами, продукцию IL-2 лимфоцитами [20]. На уровни цитокинов могла повлиять стимуляция процессов тромбогенеза, за счет усиления продукции тромбоксанов и простагландинов E,

ингибирующих продукцию IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  [13] и IL-2 [16]. Наряду с торможением роста активности провоспалительных цитокинов к 7-м сут. наблюдения в сыворотке крови отмечали выраженное увеличение концентрации IL-4, что свидетельствовало об активации гуморального иммунитета. IL-4 вызывает пролиферацию и дифференцировку активированных В-лимфоцитов, возрастание экспрессии МНС анти-

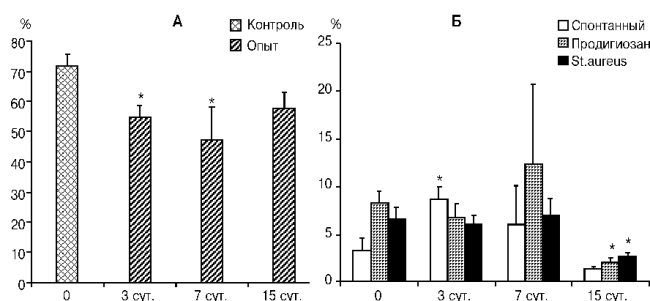


Рис. 3. Изменение функциональной активности нейтрофилов в крови после термического ожога кожи: А — % нейтрофилов, фагоцитирующих *St. aureus*; Б — % нейтрофилов, восстанавливающих НСТ до и после стимуляции; \* —  $p < 0,05$  по сравнению с интактным контролем

генов 2-го класса и низкоафинных IgE рецепторов на мембранах покоящихся В-лимфоцитов, стимулирует синтез IgG1 и IgE ингибирует синтез IgM, IgG3, IgG2a и IgG2b в активированных В-лимфоцитах [7]. Гуморальный тип иммунного ответа наиболее важен в отношении внеклеточно расположенных микробов, поскольку антитела усиливают их поглощение и переваривание фагоцитами. В нашем исследовании рост активности IL-4 в крови не влиял на реактивность нейтрофилов, что согласуется с результатами опытов *in vitro*, в которых показано, что IL-4 не влиял на окислительный метаболизм нейтрофилов и их готовность к реализации «респираторного взрыва» после стимуляции [18]. Рост активности IL-4 на 7-е сутки, видимо, способствовал защите обожженной кожи от избыточного притока нейтрофилов с высоким провоспалительным потенциалом. Показано, что эндогенное повышение уровня IL-4 тормозит инфлюкс нейтрофилов и ограничивает повреждение ткани при гломерулонефрите [19]. Снижение концентрации TNF $\alpha$  в сыворотке крови животных на 7-е сут. после ожога, очевидно, связано с активной перестройкой цитокиновой сети, что проявлялось в одновременном повышении концентрации IL-4 и отражало конкурентные отношения между этими цитокинами. В течение 2-й нед. происходило восстановление фагоцитарной и снижение биоцидной функции нейтрофилов. Падение биоцидной активности лейкоцитов сочеталось со снижением их общей реактивности. К этому времени из крови опытных животных удалялись продукты протеолиза, и уровни СМ возвращались к норме. Вслед за снижением интоксикации к 30-м сут. повышались уровни провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , что свидетельствовало о стимуляции регенерации за счет активации функций фибробластов и эндотелиоцитов, восстановления активационной способности по отношению к клеткам Лангерганса.

Таким образом, нарушение дренажной функции лимфатического аппарата кожи ведет к накоплению токсических продуктов, снижению неспецифической резистентности и к инфицированию ожоговой раны, что обусловило двухфазное изменение уровней цитокинов с различной биологической активностью. В конце 1-й нед после ожога отмечали рост уровня IL-4, продуцируемого Th2 лимфоцитами и стимулирующего клеточные реакции распознавания антигенов инфекционных агентов и поврежденных тканей. В конце 1-го месяца после ожога продукция мононуклеарными фагоцитами IL-1 $\beta$  нарастала, что приводило к активации фибробластов, кератиоцитов, эндотелиоцитов и усилению процессов регенерации и восстановлению дефекта кожи.

## Список литературы

1. **Бородин Ю.И.** Регионарный лимфатический дренаж и лимфодетоксикация // Морфология. — 2005. — Т. 127, №4. — С. 25–28.
2. **Габриелян И.И., Левицкий Э.Р., Дмитриев Н.Л.** Скрининговый метод определения средних молекул в биологических жидкостях: Метод. рекоменд. — М., 1985. — С. 20.
3. **Карякина Е.В., Белова С.В.** Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений (обзор литературы) // Клин. лаб. диагн. — 2004. — №3. — С. 3–8.
4. **Коненков В.И., Ракова И.Г., Авдошина В.В., Гельфгат Е.Л.** Комплексная оценка уровня спонтанной продукции цитокинов в культуре мононуклеарных клеток периферической крови здорового человека // Цитокины и воспаление. — 2005. — Т. 4, №2. — С. 33–37.
5. **Маянский А.Н., Маянский Д.Н.** Очерки о нейтрофиле и макрофаге. — Новосибирск: Наука, 1989. — 256 с.
6. **Маянский Д.Н., Цырендоржиев Д.Д., Макарова О.П.** и др. Диагностическая ценность лейкоцитарных тестов. II. Определение биоцидности лейкоцитов. — Новосибирск, 1996. — С. 32.
7. **Михайленко А.А., Коненков В.И., Базанов Г.А., Покровский В.И.** Руководство по клинической иммунологии, аллергологии, иммуногенетике и иммунофармакологии. В 2 т. — М.: Триада, 2005. — 1072 с.
8. **Парамонов Б.А.** Ожоги: Руководство для врачей. — СПб.: Специальная литература, 2003. — 480 с.
9. **Autore G., Marzocco S., Sorrentino R.** et al. In vitro and vivo TNF alpha synthesis modulation by methylguanidine, an uremic catabolyte // Life sci. — 1999. — Vol. 65, №11. — P. 121–127.
10. **Cavriani G., Domingos H.V., Oliveira-Filho R.M.** et al. Lymphatic thoracic duct ligation modulates the serum levels of IL-1beta and IL-10 after intestinal ischemia/reperfusion in rats with the involvement of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide // Shock. — 2007. — Vol. 27, №2. — P. 209–213.
11. **Cheng A.M., Moore E.E., Masuno T.** et al. Normal mesenteric lymph blunts the pulmonary inflammatory response to endotoxin // J. Surg Res. — 2006. — Vol. 136, №2. — P. 166–171.
12. **Deitch E.A.** Role of the gut lymphatic system in multiple organ failure // Curr. Opin. Crit. Care. — 2001. — Vol. 7, №2. — P. 92–98.
13. **Enders S., Whitaker R.E., Ghorbani R.** et al. Oral aspirin and ibuprofen increase cytokine-induced synthesis of IL-1 beta and of tumor necrosis factor-alpha ex vivo // J. Immunol. — 1996. — Vol. 87, №2. — P. 264–270.
14. **Fernandes-Botran R.** Soluble cytokine receptors: basic immunology and clinical applications // Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. — 1999. — Vol. 36, №3. — P. 165–224.
15. **Lonnemann G., Barndt I., Kaefer V.** et al. Impaired endotoxin-induced interleukin-1 beta secretion, not total production, of mononuclear cells from ESRD patients // Kidney Int. — 1995. — Vol. 47, №4. — P. 1158–1167.
16. **Miles E.A., Aston L., Calder P.C.** In vitro effects of eicosanoids derived from different 20-carbon fatty acids on T helper type 1 and T helper type 2 cytokine production in human whole-blood cultures // Clin. Exp. Allergy. — 2003. — Vol. 33, №5. — P. 624–632.
17. **Millonig G.** In Fifth International Congress in Electron Microscopy / Ed. S.S. Breese. — New York: Academic Press, 1962. — P. 8.
18. **Reglier-Puopet H., Hakim J., Gougerot-Pocidalo M.A., Elbm C.** Absence of regulation of human polymorphonuclear oxidative burst by interleukin-10, interleukine-4, interleukine-13

and transforming growth factor-beta in whole blood // Eur. Cytokine Netw. — 1998. — Vol. 9, №4. — P. 633–638.

19. **Saleem S., Dai Z., Coelho S.N.** et al. IL-4 is endogenous inhibitor of neutrophil influx and subsequent pathology in acute antibody-mediated inflammation // J. Immunol. — 1998. — Vol. 160, №2. — P. 979–984.

20. **Severini G., Diana L., Di Giovannadrea R., Saggiacchi G.** Influence of uremic middle molecules on in vitro stimulated lymphocytes and interleukine-2 production // ASAIO. — 1996. — Vol. 42, №1. — P. 64–67.

21. **Ware L.B., Matthay M.A.** The acute respiratory distress syndrome // N. J. Engl. Med. — 2000. — Vol. 348, №18. — P. 1334–1349.

22. **Watkins A.C., Caputo F.J., Badami C.** et al. Mesenteric lymph duct ligation attenuates lung injury and neutrophil

activation after intraperitoneal injection of endotoxin in rats // J. Trauma. — 2008. — Vol. 64, №1. — P. 126–130.

23. **Weid P.Y., Rainey K.J.** Review article: lymphatic system and associated adipose tissue in the development of inflammatory bowel disease // Aliment. Pharmacol. Ther. — 2010. — Vol. 32, №6. — P. 697–711.

24. **Zhao Z.G., Niu C.Y., Zhang J.** et al. Effect of mesenteric lymph duct ligation on lung injury in hemorrhagic shock rats // Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue. — 2007. — Vol. 19, №5. — P. 274–278.

Поступила 21.03.11

#### Сведения об авторах:

Коненков Владимир Иосифович, акад. РАНН, д-р мед. наук, дир. ФГБУ «НИИКЭЛ» СО РАНН

Макарова Ольга Петровна, д-р биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. ультраструктурных исследований ФГБУ «НИИКЭЛ» СО РАНН

Е.И. Асташкин<sup>1</sup>, А.В. Широкая<sup>2</sup>, Н.Д. Егорова<sup>1</sup>,  
Н.С. Орехова<sup>1</sup>, А.Н. Новикова<sup>1</sup>, А.Н. Наседкин<sup>2</sup>, С.В. Грачев<sup>1</sup>

## **Патофизиологические механизмы влияния экзогенного монооксида азота при полипозном риносинусите**

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

<sup>2</sup> Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, 129110, Москва, ул. Щепкина, 61/2

*При помощи метода хемилюминесценции произведена оценка функциональной активности функционального состояния фагоцитов крови больных полипозным риносинуситом. При этом оценивалась способность фагоцитов генерировать супероксид анион. Показано изменение ответа клеток первичного иммунитета на стандартный активатор (формил пептид) при воздействии на полость носа оксидом азота. Исследование проведено в динамике.*

**Ключевые слова:** полипозный риносинусит, фагоциты крови, супероксид анион, оксид азота, формил пептид

E.I. Astashkin, A.V. Shirokaya, N.D. Yegorova,  
N.S. Orekhova, A.N. Novikova, A.N. Nasedkin, S.V. Grachev

## **Pathophysiological mechanisms of influence of exogenous nitrogen monoxide polypous rhinosinuitis**

*By using the chemiluminescence method to evaluate the functional activity of the functional state of phagocytes blood patients with polypous rhinosinuitis. It was evaluated the ability of phagocytes generate superoxide anion. eonstrates how to change the primary immune cells respond to standard activator (formil peptide) when exposed to the nasal cavity nitrogen oxide. The research was performed in dynamics.*

**Key words:** polypous rhinosinuitis, blood phagocytes, superoxide anion, nitric oxide, formil peptide

Полипозный риносинусит (ПР) относится к числу наиболее распространенных хронических заболеваний носа и околоносовых пазух (ОНП). Это заболевание снижает качество жизни пациентов, их трудоспособность, что приводит к высокому экономическому ущербу и является важной медико-биологической проблемой. В последние годы наблюдается неуклонный рост количества пациентов с этим диагнозом [3, 4]. Важная роль в развитии ПР наряду с аллергическими процессами связана с воздействием бактерий, грибов, вирусов и их ассоциаций на слизистую оболочку носа и ОНП. При изучении их микробного состава у пациентов с ПР наиболее часто выявляют грамотрицательные бактерии (нейсерии, энтеробактерии, в том числе кишечная палочка, и др.). Известно, что грамотрицательные бактерии содержат в клеточной стенке большое количество липополисахарида (ЛПС), который защищает мембрану от агрессивных воздействий окружающей среды. ЛПС является одним из сильней-

ших активаторов провоспалительных клеток. При его действии на фагоциты человека (нейтрофилы, моноциты, макрофаги) происходит секреция воспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ ; IL-1 и др.). Другой бактериальный продукт — трипептид формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP) также выступает в качестве эффективного стимулятора фагоцитов и обладает свойствами хемоаттрактанта. Формил пептид взаимодействует на поверхности фагоцитов со специфическими рецепторами и активирует мембранный фермент — фосфолипазу C, который гидролизует фосфотидил инозитольные фосфолипиды, что приводит к образованию двух вторичных мессенджеров: инозитол-трисфосфата (IP<sub>3</sub>) и диацилглицерина (DAG). IP<sub>3</sub> вызывает выход Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточного кальциевого депо, а DAG стимулирует протеинкиназу C (PKC). Эти два процесса приводят к самосборке на плазматической мембране NADPH-оксидазного комплекса, увеличение активности которого сопровождается образованием большого количества супероксид анионов (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>). В результате одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода (O<sub>2</sub>) в клетках образуется O<sub>2</sub><sup>-•</sup> [1, 2, 5, 7, 8, 11, 14].

Для корреспонденции: Широкая Анна Вадимовна, аспирант ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.В. Владимирского.  
E-mail: 6018637@mail.ru

В ответ на некротическую гибель клеток, в слизистой оболочке носа и ОНП при ПР, происходит выход фагоцитов крови (прежде всего нейтрофилов, а затем моноцитов) из кровеносных сосудов в пораженную ткань, где они активируются и продуцируют радикалы кислорода. Как известно, фагоциты крови могут существовать в трех состояниях: неактивном, преактивированном (праймированном) и активном. Преактивированные фагоциты не способны секретировать в крови большое количество радикалов кислорода и других биологически активных веществ, но быстро увеличивают уровень  $O_2^{\cdot-}$  при последующем действии стимулирующего агента.

Одним из факторов септического воспаления являются молекулы оксида азота (NO). Считается, что наличие высоких концентраций NO в ОНП выступает в качестве условия ее стерильности. В то же время, физиологический уровень NO вызывает вазодилатацию микрососудов, а также способствует нормальной активности мерцательного эпителия. При уменьшении концентрации NO происходит замедление частоты биения ресничек мерцательного эпителия и, как следствие, изменение мукоцилиарного транспорта. При низком уровне NO происходит нарушение функциональной активности мерцательного эпителия, что является ключевым в патогенезе ПР [10]. Взаимодействие NO с  $O_2^{\cdot-}$  приводит к образованию пероксинитрита ( $NOOO^{\cdot-}$ ) и снижению уровня NO. Экспериментально показано, что при ПР уровень эндогенного NO в полости носа ниже, чем у здоровых. По мнению ряда авторов, эффективное лечение больных ПР связано с повышением уровня эндогенного NO в полости носа [6, 9, 12, 13].

*Цель работы* — изучение функционального состояния фагоцитов крови при действии экзогенного оксида азота у пациентов с полипозным риносинуситом.

### Методика

Материалом для исследования служила цельная кровь семи больных полипозным риносинуситом. Из них 1 женщина и 6 мужчин. Возраст больных составил  $55 \pm 10$  лет. Для проведения NO-терапии использовали газовый поток экзогенного оксида азота, получаемый при пропускании атмосферного воздуха через универсальный отечественный аппарат для хирургии и NO-терапии «Скальпель-коагулятор-стимулятор «ПЛАЗОН» (образующий NO из атмосферного воздуха). Всем пациентам проводили NO-терапию ежедневно в течение 5 сут. как до, так и после хирургического вмешательства (эндоскопическая двусторонняя гайморэтомидотомия). Сеансы проводили после туалета носа с экспозицией по 1 мин в каждую его половину. Расстояние от наконечника ПЛАЗОН-а до преддверия полости носа составляло

2 см. Использовали минимальный расход воздуха для избегания негативных ощущений у пациента. В послеоперационном периоде применяли традиционную схему лечения: антибактериальная терапия, туалет полости носа, промывание околоносовых синусов физиологическим раствором.

Для оценки функциональной активности фагоцитов крови использовали их способность генерировать  $O_2^{\cdot-}$ . У каждого пациента полипозным риносинуситом проводили забор венозной крови непосредственно перед измерением  $O_2^{\cdot-}$ . Объем одной пробы для измерения  $O_2^{\cdot-}$  был равен 50—100 мкл. Супероксид анион регистрировали с помощью метода хемилюминесценции (ХЛ) люцигенина (конечная концентрация 20 мкМ) на отечественном хемилюминометре «Биотокс-7». Результаты выражали в количестве импульсов в секунду. В качестве стандартного активатора фагоцитов крови использовали fMLP фирмы «Sigma».

Измерения ХЛ проводились при поступлении в стационар (исходный уровень), после пяти сеансов NO-терапии (перед операцией) и на пятые сутки послеоперационного периода и проводимого в послеоперационном периоде лечения (в том числе и пяти сеансов NO-терапии). Для изучения отдаленных результатов, аналогичное исследование проводили через 6 мес. после окончания курса лечения.

Дополнительно исследовали бактериальную обсемененность слизистой оболочки носа. Для этого изучали мазки, взятые у больных полипозным риносинуситом при поступлении в стационар и на пятые сутки после операции и проведения лечения в послеоперационном периоде. Первичный посев проб клинического материала осуществляли количественным методом на плотные питательные среды. Идентификацию выделенных чистых культур осуществляли общепринятыми методами.

### Результаты и обсуждение

Установлено, что характерным признаком фагоцитов крови, у пациентов с полипозным риносинуситом, является их исходная преактивация (праймирование). Об этом свидетельствует монотонное возрастание базального уровня, наблюдаемое при взаимодействии фагоцитов крови со стенкой кюветы, а также последующий высокоамплитудный ответ на стандартный активатор фагоцитов. Последующая добавка fMLP (1 мкМ) вызывала увеличение образования  $O_2^{\cdot-}$  (рис. 1).

После проведения NO-терапии отмечали усиление преактивации фагоцитов крови (уровень спонтанного образования  $O_2^{\cdot-}$  был примерно в 4 раза выше). Ответ на стандартный активатор (fMLP, 1 мкМ) усиливался и сохранялся на высоком уровне в течение последующих 30 мин регистрации исследования (рис. 2).

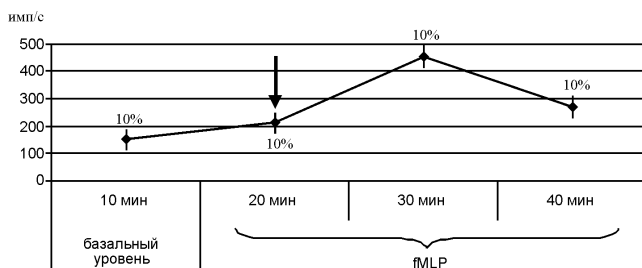


Рис. 1. Динамика изменения базального уровня образования  $O_2^{\bullet-}$  в пробах цельной крови пациентов с полипозным риносинуситом и их ответ на fMLP — формил пептид (1 мкМ, стрелкой показана добавка fMLP). Пациенты до лечения

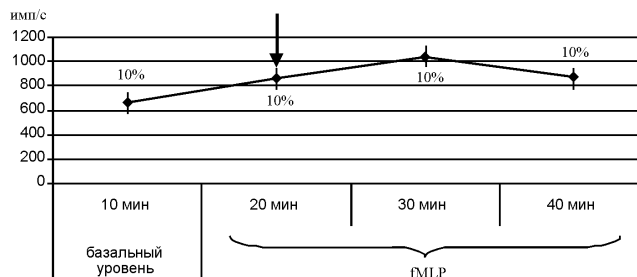


Рис. 2. Динамика изменения базального уровня образования  $O_2^{\bullet-}$  в пробах цельной крови пациентов с полипозным риносинуситом и их ответ на fMLP — формил пептид (1 мкМ, стрелкой показана добавка fMLP). После 5 сеансов NO-терапии (1 сеанс в день)

После проведения операции и дополнительного курса NO-терапии наблюдалась следующая картина: базальный уровень  $O_2^{\bullet-}$  был исходно высоким и тенденция к его возрастанию сохранялась в течение последующего времени регистрации (клетки были праймированными). Однако, ответ на активатор (fMLP) сохранялся и увеличивался во времени. Ответ на активирующий агент был достоверно более высоким по сравнению с базальным уровнем (рис. 3).

В качестве рабочей гипотезы было выдвинуто предположение о том, что такая картина ответа фагоцитов крови на стандартный активатор вызывает снижение количества NO, образующегося в результате воздействия экзогенного NO после операции на слизистую оболочку полости носа.

Определение генерации  $O_2^{\bullet-}$  фагоцитами крови через 6 мес. выявило следующую картину: резко увеличился исходный базальный уровень  $O_2^{\bullet-}$ , этот уровень продолжал расти в течение всего периода измерения, а fMLP стимулировал дополнительное образование  $O_2^{\bullet-}$  во времени (рис. 4).

Как следует из полученных результатов, исходный уровень активности фагоцитов крови у пациентов с ПР был снижен по сравнению с кровью доноров. В результате воздействия экзогенным NO происхо-

дит увеличение как базального уровня образования радикалов кислорода, так и усиление функционального ответа на стандартный стимулятор (fMLP). В результате проведения операции и дополнительного курса NO-терапии отмечается увеличение суммарной продукции  $O_2^{\bullet-}$ . Можно предположить, что это благоприятно воздействует на ведущий фактор патогенности, в качестве которого выступает бактериальная обсемененность слизистой оболочки носа и ОНП.

Как показывают исследования активности фагоцитов крови пациентов ПР через 6 мес, наблюдается сохранение высокой активности клеток системы врожденного иммунитета, что находило свое отражение как в исходном уровне активности фагоцитов крови, так и в ответах на fMLP. В мазке со слизистой оболочки носа встречались: Strep. гр D — 50%, enterococcus faecium — 10%, S.aureus — 12,5%, CNS — 12,5%, Neisseria spp. — 12,5%, E.coli — 12,5%, Candida spp. — 10%. Таким образом, показатели микробной обсемененности указывали на наличие дисбиоза слизистой оболочки носа. На 5-е сут. после хирургического вмешательства и проведения сеансов NO-терапии St. aureus в посевах из полости носа не выявлялся, но отмечалось увеличение обсемененности слизистой полости носа условно-патогенными микроорганизмами, в

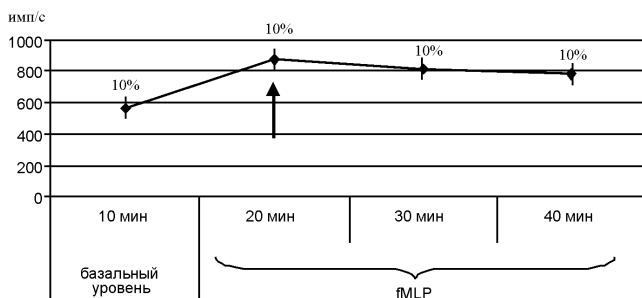


Рис. 3. Динамика изменения базального уровня образования  $O_2^{\bullet-}$  в пробах цельной крови пациентов с полипозным риносинуситом и их ответ на fMLP — формил пептид (1 мкМ, стрелкой показана добавка fMLP). После операции и пяти сеансов NO-терапии (1 сеанс в день)

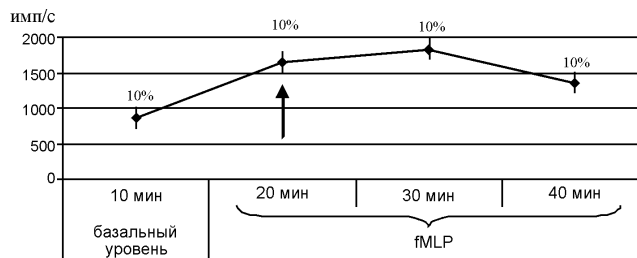


Рис. 4. Динамика изменения базального уровня образования  $O_2^{\bullet-}$  в пробах цельной крови пациентов с полипозным риносинуситом и их ответ на fMLP — формил пептид (1 мкМ, стрелкой показана добавка fMLP). Через 6 мес. после лечения

том числе коагулазонегативными стафилококками (CNS) на 12%. Таким образом, после операции, которая не влияет на обсемененность и последующей NO-терапией на фоне антибиотикотерапии позволяет у больных ПР снизить обсемененность микроорганизмами слизистой оболочки носа патогенными и условно-патогенными микроорганизмами.

В заключение следует отметить, что пациенты с ПР характеризуются исходно сниженной активностью фагоцитов крови, которые слабо отвечали на стандартный стимулятор. NO-терапия усиливает функциональную активность клеток врожденного иммунитета. В связи с этим можно сделать предположение, что антибактериальная терапия в совокупности с NO-терапией снижает значение ведущего фактора патогенности — обсемененности бактериями.

### Список литературы

1. *Арефьева Н.А., Медведев Ю.А.* Иммунологические аспекты оториноларингологии // *Новости оториноларингологии и логопатологии.* — 1997. — №4. — С. 3—10.
2. *Бондарева Г.П., Терехова А.О.* Роль инфекции в формировании полипозного риносинусита у больных бронхиальной астмой // *Вестник оториноларингологии.* — 2010. — №3. — С. 9—11.
3. *Лопатин А.С.* Медикаментозное и хирургическое лечение полипозного риносинусита. Лечение синусита, ассоциированного с бронхиальной астмой // *Рос. Ринология.* — 1999. — №1. — С. 65—67.
4. *Миракян Р.Г.* Дифференциация полипозного риносинусита и их лечение // *Российская ринология.* — 2006. — №2. — С. 16—18.1.

5. *Bachert C., Gevaert P., Cauwenberge P.* Staphylococcus aureus superantigen and airway disease // *Curr. Allergy Asthma ReP.* — 2002. — №2. — P. 252—258.

6. *Deja M., Busch T., Bachmann S., Riskowski K., Campan V., Wiedmann B., Schwabe M., Hell B., Pfeilschifter J., Falke K.J., Lewandowski K.* Reduced nitric oxide in sinus epithelium of patients with radiologic maxillary sinusitis and sepsis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2003. — Vol. 1, №168(3). — P. 265—266.

7. *Fokkens W., Lund V., Mullol J.* et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps. — 2007.

8. *Gevaert P.* Differentiation Between chronic sinusitis with and without nasal polyps based on cytokine profiles // *Российская ринология.* — 2006. — №2. — С. 32.

9. *Lindberg S., Cervin A., Runer T.* Low levels of nasal nitric oxide (NO) correlate to impaired mucociliary function in the upper airways // *Acta Otolaryngol.* — 1997. — Vol. 117, №5. — P. 728—734.

10. *Pasto M., Serrano E., Urocoste E.* et al. Nasal polyp-derived superoxide anion: dose-dependent inhibition by nitric oxide and pathophysiological implications // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2001. — Vol. 163, №1. — P. 145—151.

11. *Richelman H.* Bacterial infection: does it play a role in eosinophilic inflammation and nasal polyposis? // *Российская ринология.* — 2006. — №2. — С. 34.

12. *Tavaf-Motamen H., Miner T.J., Starnes B.W.* et al. Nitric oxide mediates acute injury by modulation of inflammation // *J. Surg Res.* — 1998. — Vol. 78, №2. — P. 137—142.

13. *Xie Q.W., Kashiwarbara Y., Nathan C.* Role of transcription factor NFkB in induction of nitric oxide synthase // *J. Biol. Chem.* — 1994. — Vol. 269. — P. 4705—4708.

14. *Zhou B., Li H., Han D., Liu Z.* Role of ICAM-1 in eosinophilia and prognosis of nasal polyps // *Acta otolaryngol.* — 2005. — Vol. 125. — P. 745—752.

Получена 24.10.12

### Сведения об авторах:

*Асташкин Евгений Иванович*, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. экстремальных состояний им. Чечулина НИО кардиологии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ

*Егорова Нина Дмитриевна*, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. экстремальных состояний им. Чечулина НИО кардиологии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ

*Орехова Наталия Стефановна*, канд. мед. наук, старш. науч. сотр. лаб. экстремальных состояний им. Чечулина НИО кардиологии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ

*Новикова А.Н.*, канд. биол. наук, лаборант-исследователь, лаб. экстремальных состояний им. Чечулина НИО кардиологии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ

*Наседкин Алексей Николаевич*, канд. мед. наук, проф. каф. оториноларингологии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского

*Грачев Сергей Витальевич*, д-р мед. наук, акад. РАМН, проф., директор НИИ молекулярной медицины ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ



М.Х. Диланян<sup>1</sup>, Н.И. Новикова<sup>2</sup>, А.А. Орлов<sup>1</sup>, И.Н. Сабурин<sup>1</sup>, В.С. Репин<sup>1</sup>, Э.Е. Евсеенков<sup>1</sup>

## ***Морфологическое исследование динамики замещения костного цемента Norian CRS® Fast Set™ de novo костной тканью на модели направленной остеointеграции нижней челюсти у крыс CD***

<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> Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 142290, Пущино, Московская обл., просп. Науки, 6

*В статье представлена попытка разработки новой методики, направленной на остеointеграцию в дефицитных участках альвеолярного отростка челюстей на модели остеointеграции титанового винта, имитирующего имплантат с de novo костной тканью с использованием костного цемента Norian CRS® Fast Set™. Было проведено доклиническое исследование специфической активности этого материала при остеointеграции у животных (крысы CD).*

**Ключевые слова:** дентальная имплантация, костная пластика, современные остеопластические материалы

M.H. Dilanyan<sup>1</sup>, N.I. Novikova<sup>2</sup>, A.A. Orlov<sup>1</sup>, I.N. Saburina<sup>1</sup>, V.S. Repin<sup>1</sup>, E.E. Yevseyenkov<sup>1</sup>

## ***Morphological study of dynamics of replacement of bone cement Norian CRS® Fast Set™ de novo bone on line model of osseointegration mandible rats CD***

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

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

*In this paper an attempt to develop a new methodology designed to osteointegration in areas deficient alveolar jaw model of osteointegration of titanium screws, simulating an implant with de novo bone using bone cement Norian CRS® Fast Set™ in animals (rats CD), is described. A pre-clinical study of this material specific activity during osteointegration in animals is presented.*

**Key words:** dental implants, bone grafting, modern osteoplastic materials

На настоящий момент имеется широкий выбор остеопластических материалов для оптимизации остеогенеза в стоматологии. Золотым стандартом в костной трансплантологии является собственная кость [1—6], но для её использования необходима дополнительная операция, а значит дополнительная травма. В статье предпринята попытка разработки новой методики, направленной на остеointеграцию в дефицитных участках альвеолярного отростка челюстей на модели остеointеграции титанового винта, имитирующего имплантат с de novo костной тканью с использованием костного цемента Norian CRS® Fast Set™. Он представляет собой пластичный биосовместимый заменитель костного вещества, затвердевающий при

температуре тела. После полного отвердения этот остеопластический материал имеет близкое сходство с минеральным веществом кости и постепенно замещается костной тканью благодаря поглощению остеокластами в процессе образования de novo кости.

*Цель исследования* — доклиническое изучение специфической активности этого материала при остеointеграции у животных (крысы CD).

### **Методика**

Всего проперировано 24 крысы-самца линии CD в возрасте 12—14 нед., масса тела 350—400 г. Перед операцией животное фиксировали на специальной пластине, после чего осуществляли рентген-контроль операционной области с использованием портативного рентгенографа-визиографа (Osstem, Южная Корея). Производили разрез кожи скальпелем в подче-

**Для корреспонденции:** Диланян Мамикон Хачатурович, аспирант ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: mdilanyan@mail.ru

люстной области слева длиной 1,5 см, края раны раздвигали. Полутупым путем отодвигали жевательную мышцу, после чего выделяли и скелетизировали тело и угол нижней челюсти. Острым распатором была проведена остеотомия костного ложа выделенной области.

С применением аппарата физиодиспенсор была проведена перфорация с охлаждением физраствором в области операции с отступом от края нижней челюсти 2—3 мм. В перфорационное отверстие был помещен и фиксирован титановый винт—имплантат (диаметр: 1,5 мм, длина: 4 мм; Конмет, Россия) на глубину 2 мм. Затем проводили подготовку зоны имплантации. Удаляли сгустки крови и остатки тканей с костной поверхности, контролируя активное кровотечение. Жидкий компонент был влит в порошок и размешивался в течение 45 с до получения гомогенной массы. Далее костный цемент был немедленно нанесен на костную поверхность и винт-имплантат, после чего массу остеопластического материала придали надлежащую форму. Цемент затвердевал в течение 3—6 мин при температуре тела животного. В процессе отвердевания костный цемент поддерживался влажным для чего 2 раза в мин капельно орошали массу теплым физраствором. Далее рана была послойно ушита с использованием полигликолидной плетеной нити (викрилового шовного материала «Викрил») №4.0. По ходу операции осуществлялся контроль гемостаза. После операции делался рентген-контроль операционной области с использованием аппарата портативный рентгенограф. Далее область операции была обработана аэрозолем Aluspray, представляющим собой суспензию из микропорошка алюминия, применяемого для защиты поверхности раны. Сразу после операции в/м вводился антибио-

тик Байтрил (Эндофлуксаин) 5% по 0,1 мл на животное из расчета примерно 10 мг/кг. В дальнейшем антибиотик вводился на 2 сут. после дня операции. Повторный рентген-контроль осуществляли перед некропсией животных.

Гистологическое исследование модели остеointеграции проведено на 21, 60, 120 и 180 сут. после хирургической операции. Из каждой группы выводили по три животных на 21, 60, 120 и 180 сут. после операции.

Выделенные левые нижние челюсти (рис. 1 и 2) со стороны операции всех животных подвергнуты гистологическому анализу. После фиксации в 10% нейтральном формалине левые нижние челюсти подвергнуты декальцификации в Трилоне Б. После чего из каждой челюсти вырезан фрагмент кости вместе с винтом-имплантатом и остеопластическим материалом NoGian CRS толщиной, примерно 5—6 мм. Декальцифицированные фрагменты обезвоживали, пропитывали парафином; парафиновые блоки нарезали на секции толщиной 5—6 мкм. Для окрашивания брали каждую 5-ю секцию от начала нарезки блока. Секции окрашивали гематоксилин-эозином и пикрофуксином по Ван-Гизон. Окрашенные секции исследовали методом световой микроскопии.

### Результаты и обсуждение

К 21 сут. в области контакта костного ложа с остеопластическим материалом заметно утолщается периост костного ложа нижней челюсти в основном за счет гиперплазии волокнистого слоя надкостницы, в котором отмечено много кровеносных сосудов. Известно, что формированию костной ткани предшествует ангиогенез или прорастание сосудов в области, где предполагается образование кости. Волокнистый слой надкостницы вместе с кровеносными сосудами прорастает в остеопластический

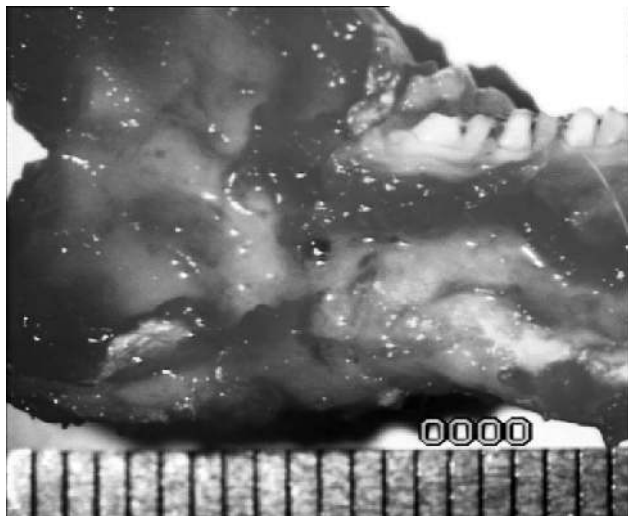


Рис. 1. Внутренняя поверхность нижней челюсти

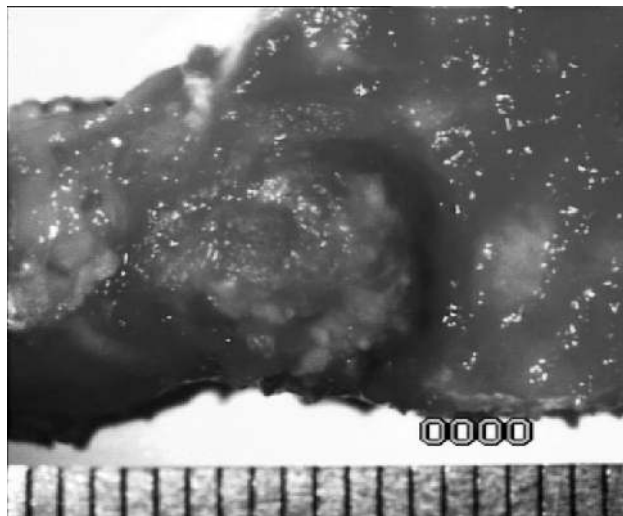


Рис. 2. Наружная поверхность нижней челюсти

материал Norian вдоль титанового винта и в этой области отмечены небольшие участки *de novo* кости. Этот факт указывает на то, что уже на раннем сроке отмечены признаки остеоинтеграции. Со стороны остеогенного слоя надкостницы отмечено присутствие относительно большого количества остеобластов, которые в дальнейшем примут участие в формировании костных трабекул. *De novo* образованные костные трабекулы объединяются и начинают формировать будущие костномозговые каналы и полости. Изнутри костномозговые каналы покрыты тесным рядом остеобластов, в каналы и полости прорастают кровеносные сосуды и уже на 21 сут. в полостях отмечено образование миелоидной ткани. Верхняя часть остеопластического материала, прилежащая к скелетной мускулатуре, покрыта соединительнотканной капсулой, которая на определенном уровне объединяется с волокнистым слоем периоста и, таким образом, остеопластический материал оказывается полностью инкапсулированным. По мере замещения Norian *de novo* костной тканью эта соединительнотканная капсула становится волокнистым слоем периоста. Уже на 21-е сут. местами отмечено прорастание соединительной ткани и сосудов в остеопластический материал, как со стороны волокнистого слоя периоста, так и со стороны соединительнотканной капсулы, расположенной выше скелетной мускулатуры. Со стороны соединительнотканной капсулы, непосредственно прилежащей к поверхности остеопластического материала отмечены гигантские многоядерные эпителиоидные клетки. В данной ситуации не совсем ясна природа этих клеток. Можно предположить, что этими клетками являются гигантские клетки инородных тел, имеющих название Пирогова—Лангханса, которые, как известно, образуются за счет слияния макрофагов. В нашем случае со стороны соединительной ткани скелетной мускулатуры отмечена заметная клеточная реакция мононуклеаров с преобладанием лимфоцитов. На этом этапе описания процесса следует сделать небольшое отступление в связи с тем, что у хирургов, использующих этот остеопластический материал в клинике в случае неблагоприятного исхода операции, возникало мнение, что негативные последствия могут возникать в связи с попаданием небольших фрагментов материала в мышечную ткань. Это мнение мы опровергаем на основании того, что у ряда животных были отмечены в мышцах небольшие фрагменты остеопластического материала, которые были инкапсулированы и со стороны соединительнотканной капсулы атаковались большим количеством многоядерных клеток, принимающих участие в деградации материала. При этом признаки воспаления не были отмечены.

Для того чтобы понять, как происходит увеличение объема кости, следует представить следующее: на костную поверхность помещали остеопластический материал, сформировав из него небольшой бугорок, и уже к 21-м суткам можно было наблюдать, как костная ткань

начинает покрывать бугорок остеопластического материала. В дальнейшем, в более поздние сроки костная ткань покрывает полностью бугорок остеопластического материала. В свою очередь, остеобласты с поверхности костного ложа, о которых уже было упомянуто, формируют костные трабекулы внутри остеопластического материала, которые исполняют роль каркаса, таким образом формируя и укрепляя остеоинтеграцию костного ложа с Norian. На основании анализа целого ряда образцов модели остеоинтеграции было очевидно, что почти у всех животных объем *de novo* кости значительно больше со стороны альвеолярного отростка.

Все вышеописанные процессы отмечались на каждом сроке гистологического анализа. Следует отметить, что выраженность этих процессов у ряда животных не зависела от сроков наблюдения, из чего следует, что процесс остеоинтеграции носит индивидуальный характер и в дальнейших работах нами ставится задача выявить факторы, влияющие на скорость процессов, в итоге приводящих к образованию *de novo* кости. Однако, в целом, на основании анализа всех образцов модели остеоинтеграции, некоторая закономерная динамика имеет место, которая проявилась в выраженности описанных процессов на различных сроках наблюдения. Так, к 60-м сут. объем *de novo* костной ткани заметно больше по сравнению с 21-ми сутками. К 120-м сут. замещение остеопластического материала Norian *de novo* костью становится более выраженным. *De novo* костные трабекулы сформировали костномозговые полости, покрытые эндостом. К 60-м сут. в остеогенном слое эндоста отмечено много остеобластов, но к 120-м сут. их количество уменьшается. На эти сроки наблюдения в костномозговых полостях отмечено много миелоидной ткани. Значительный объем *de novo* кости образовался в области, прилегающей к титановому винту. У ряда животных отмечено формирование *de novo* костной ткани в этой области со стороны внутренней поверхности челюсти. К 180-м сут. объем *de novo* кости увеличивается еще больше и у ряда животных остеопластический материал Norian оказывается полностью покрыт *de novo* костью.

На поздних сроках наблюдения привлек внимание следующий факт. В случаях, когда во время операции остеопластический материал Norian был использован в количестве, достаточном для того, чтобы только слегка покрыть поверхность титанового винта, замещение материала *de novo* костной тканью происходило более быстрее, или точнее было бы употребить слово *полно*.

Следует отметить, что у одного животного на 60-е сут. и у одного животного на 120-е сут. отмечены заметные признаки воспаления в виде: присутствия в остеопластическом материале умеренного количества нейтрофилов, а также умеренной реакции со стороны мононуклеаров.

Таким образом: 1 — с 21-х по 60-е сут. после операции отмечается активная пролиферация остеобластов со стороны остеогенного слоя периоста костного ложа и начинается формирование *de novo* ткани; 2 — к 60-м сут. со стороны костного ложа формируются *de novo* образованные костные трабекулы, со стороны эндоста отмечается выраженная пролиферация остеобластов. К этому сроку в костномозговых каналах *de novo* кости происходит формирование миелоидной ткани; 3 — к 120-м и 180-м сут. отмечена хорошая остеоинтеграция в области винта-имплантата; 4 — к 180-м сут. со всех сторон вокруг остеопластического материала Norian полностью формируется *de novo* костная ткань, имеющая тонкопластичную структуру, характерную для зрелой кости.

### Список литературы

1. *Дробышев А.Ю.* Применение биокomпозиционных материалов и костной пластики для увеличения размеров альвеолярного отростка верхней челюсти в целях создания оптимальных условий для дентальной имплантации // Материалы 8–9-го Всерос. Науч.-практ. конф. и Труды 7-го съезда Стомат.Асс. России. — М., 2002. — С. 285–287.
2. *Литвиненко А.Н.* Дентальная имплантация при недостаточном объеме костной ткани альвеолярной части нижней челюсти: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — М., 2005. — 23 с.
3. *Цогоев В.К.* Обоснование использование биорезорбируемых средств при непосредственной и ранней отсроченной дентальной имплантации: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — М., 2007. — 22 с.
4. *Трунин Д.А., Кирилова В.П., Беззубов А.Е.* Клиническая оценка результатов использования новой остеопластической композиции для замещения дефектов альвеолярных отростков челюстей // Материалы 17 и 18 Всерос. Науч.-практ. Конф. и 1 Общевропейского стоматологического конгресса. — М., 2007. — С. 98–101.
5. *Baker S.B., Weinzweig J., Kirschner R.E., Bartlett S.P.* Applications of a new carbonated calcium phosphate bone cement; early experience in pediatric and adult craniofacial reconstruction // *Plast. Reconstr. Surg.* — 2002. — 109. — P. 1789–1796.
6. *Elder S., Frankenburg E., Goulet J., Yetkinler D., Poser R., Goldstein S.* Biomechanical evaluation of calcium phosphate cement augmented fixation of unstable intertrochanteric fractures // *J. Orthop. Trauma.* — 2000. — 14. — P. 386–393.

Поступила 03.12.12

### Сведения об авторах:

*Новикова Надежда Ивановна*, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. биологических испытаний ФИБХ РАН

*Орлов Андрей Алексеевич*, проф., д-р мед. наук, зав. лаб. трансляционной медицины ФГБУ «НИИОПП» РАМН

*Сабурина Ирина Николаевна*, д-р биол. наук, зав. лаб. новых клеточных технологий ФГБУ «НИИОПП» РАМН

*Репин Вадим Сергеевич*, проф., член-корр. РАМН д-р биол. наук, ведущий науч. сотр. Лаб. новых клеточных технологий. ФГБУ «НИИОПП» РАМН

*Евсеевков Эдуард Евгеньевич*, аспирант ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Панченко Л.Ф.<sup>1,2</sup>, Пирожков С.В.<sup>2,4</sup>, Теребилина Н.Н.<sup>2</sup>, Наумова Т.А.<sup>2</sup>,  
Баронец В.Ю.<sup>2</sup>, Шойбонов Б.Б.<sup>1,2</sup>, Мерззликина Н.Н.<sup>5</sup>, Журавлева А.С.<sup>3</sup>

## **Нарушения механизмов, контролирующих реакцию иммунных и печеночных клеток на эндотоксин, в патогенезе алкоголь-индуцированных заболеваний печени. Гипотеза «двойного удара»**

<sup>1</sup> ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАМН,  
РФ, Москва, 125315, Москва, Балтийская ул., 8

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный научный центр наркологии» Минздрава РФ, 119002, Москва, М. Могильцевский пер., 3

<sup>3</sup> Кафедра госпитальной терапии Российского университета дружбы народов, Москва

<sup>4</sup> Московская медицинская академия им. И.М.Сеченова, кафедра патофизиологии

<sup>5</sup> Кафедра госпитальной терапии №2 лечебного факультета Российского государственного медицинского университета им. Н.И. Пирогова

*Исследовано состояние иммунноклеточных популяций, а также компонентов плазмы, осуществляющих контроль реакции на эндотоксин, у больных алкоголь-индуцированными болезнями печени (АБП) (алкогольный гепатит, алкогольный цирроз печени, острая атака гепатита на фоне цирроза печени). Результаты сопоставлены с выраженностью маркеров воспалительной и фиброзной патологии печени (содержание цитокинов, иммунноклеточные показатели воспаления, биохимические и клинические параметры гепатоцеллюлярной патологии). Полученные данные показали важную роль дисбаланса T регуляторной и Th17 популяций лимфоцитов, а также дефицита компонентов плазмы, нейтрализующих воспалительный потенциал эндотоксина (липопротеинов высокой плотности) при одновременном возрастании усиливающих воспаление многократно модифицированных липопротеинов низкой плотности (ммЛПНП) и С-реактивного белка в прогрессировании гепатопатологии при АБП. Предложена гипотеза о двух параллельно протекающих механизмах патогенеза АБП: патологическая реакция на эндотоксин и реакция на ммЛПНП, опосредуемых двумя различными фенотипами макрофагов.*

**Ключевые слова:** алкоголь-индуцированные заболевания печени, T регуляторные клетки, Th17-клетки, цитокины, липопротеины, пенстые клетки, NO-синтаза, фенотипы макрофагов

Panchenko L.F., Pirozhkov S.V., Terebilina N.N., Naumova T.A.,  
Baronetz V.J., Shoibonov B.B., Merzhlikina N.N., Zhuravleva A.S.

## **Disturbances of the control mechanisms over immune and liver cell response to endotoxin and their role in pathogenesis of the alcohol-induced liver diseases. Hypothesis of Dual Strike**

*Immune cells and plasma components controlling over reaction to endotoxin in alcohol-induced liver diseases (ALD) (alcohol hepatitis, liver cirrhosis and acute attack of hepatitis with liver cirrhosis) have been studied and compared with markers of inflammatory and fibroid hepatopathology (cytokines, immunocellular, biochemical and clinical indicators of hepatocellular damage). Our data support a role for deficiency of T regulatory cells and plasma components suppressing inflammatory potential of endotoxin (high density lipoproteins and albumin) coupled with hyperproduction of proinflammatory multi-modified low density lipoproteins (mmLDL) and C-reactive protein in ALD progression. Association of mmLDL with switching tolerogenic phenotype of macrophage to inflammatory and NO-synthase -deficient phenotypes and Th17-dependent inflammatory reaction has been showed.*

**Key words:** alcohol-induced liver diseases, T regulatory cells, cytokines, lipoproteins, foam cells, NO-synthase, macrophage phenotypes

**Для корреспонденции:** Шойбонов Батожаб Батожагаралович, канд. хим. наук, вед. науч. сотр. лаб. биохимии ФГБУ «НИИОПГ» РАМН, ФГБУ «ННЦН» Минздрава РФ. E-mail: shoibonov@mail.ru

## Введение

Алкогольная болезнь печени (АБП) остается одной из наиболее частых причин смерти больных алкоголизмом, что обусловлено, в частности, недостаточным пониманием ее патогенеза, затрудняющим разработку адекватной терапевтической стратегии. В наших предыдущих работах была показана важная роль эндотоксинемии, сопровождающейся гиперпродукцией провоспалительных и фиброзогенных цитокинов, в иницировании и прогрессировании АБП [5—7]. Однако остается неясным, почему эндотоксин или липополисахариды (ЛПС) клеточных стенок Грам-отрицательных бактерий кишечника, которые в норме постоянно контактируют с клетками печени, поддерживая печеночные макрофаги (клетки Купфера) на подпороговом уровне их активации, обеспечивающем толерантность организма к этим бактериальным антигенам, у больных АБП вызывают необычно сильную воспалительную реакцию.

К настоящему времени описано существование в организме многочисленных механизмов, ограничивающих развертывание эндотоксин-индуцированного воспаления даже в условиях повышенной проницаемости слизистого барьера кишечника. Обзор некоторых из этих механизмов был приведен нами ранее [8]. Центральное место среди них занимает особая популяция лимфоцитов: Т-регуляторные клетки (Трег). Иммунорегулирующей способностью обладают также НКТ-лимфоциты (натуральные киллеры тимусного происхождения), одна из самых многочисленных популяций лимфоцитов в печени, и регуляторный (или толерогенный) фенотип макрофагов, к которому в норме принадлежат печеночные клетки Купфера, а также большинство моноцитов крови. В поддержании регуляторного фенотипа макрофагов участвуют липопroteины высокой плотности (ЛПВП), рецепторы которых: SR-B1 (к липидному компоненту ЛПВП) и ABCA1 (к главному белковому компоненту ЛПВП — аполипопротеину А1) включают в макрофагах сигнальные пути, ингибирующие синтез провоспалительных цитокинов и стимулирующие синтез регуляторных цитокинов — IL-10 и TGF- $\beta$ 1. Роль ЛПВП в антиэндотоксиновой защите определяется также их способностью блокировать доступ эндотоксина к распознающим рецепторам макрофагов: CD14 и TLR4, связывая эндотоксин и перенося его в гепатоциты, где он подвергается процессингу и выводится с желчью. В норме с помощью ЛПВП выводится свыше 80% эндотоксина.

Целью настоящей работы была характеристика состояния основных механизмов, способных контролировать реакцию на эндотоксин, у больных АБП на разных стадиях прогрессирования болезни.

## Материал и методы исследования

Исследования были проведены у 138 больных алкоголизмом, проходивших лечение в 12-й, 64-й и 53-й ГКБ г.Москвы. Из них у 29 больных был диагностирован алкогольный гепатит (АГ), у 63 — алкогольный цирроз печени (АЦП) и у 46 — алкогольный цирроз печени с атакой острого гепатита (АЦП+АОГ). Диагноз алкогольной болезни печени и ее стадии установлен на основании клинико-лабораторных и инструментальных методов исследования.

Для оценки Трег клеток использовали цитохимическое исследование двух эктонуклеотидаз: NTDP1 (нуклеозид-трифосфат-дифосфогидролаза-1, ЕС 3.6.1.5) и 5'-NT (5'-нуклеотидаза, ЕС 3.1.3.5) — в мазках, приготовленных из лимфоцитарной суспензии, свежeweыделенной из периферической крови больных [4, 57]. Совместная экспрессия указанных нуклеотидаз является уникальной ситуацией среди всех Т-лимфоцитов и поэтому расценивается как надежный маркер Трег популяции, по селективности сопоставимый с ядерным маркером Foxp3 и превосходящий часто применяемый с этой целью двойной маркер CD4+/CD25+ [20, 23]. Высокая активность NTDP в отсутствие 5'-NT маркирует Т-клетки памяти, т.е. клетки, уже участвовавшие в реакции на определенный антиген и способные при новой встрече с ним развертывать быстрый и эффективный ответ на него [43]. Считается, что NTDP маркирует главным образом клетки памяти T<sub>H</sub>17-направленности.

Количество других популяций иммунных клеток определяли методом проточной цитометрии по CD-маркерам.

Для характеристики моноцитов использовали цитохимическое определение внутриклеточных липидов по Кайну с нильским голубым и суданом черным В [2], подсчитывая процентное количество моноцитов, содержащих более 10 гранул судана черного В [39]. Определяли также процент вакуолизированных и «пенистых» моноцитов при окраске по Романовскому и проводили цитохимическое определение НАДФН-редуктазного домена NO-синтазы [58]. Продукцию оксида азота оценивали по содержанию в плазме крови его стабильных метаболитов: нитритов и нитратов реакцией Грисса после депротенинизации и редукции нитратов гранулированным кадмием [1]. В качестве дополнительного критерия доминирующего фенотипа моноцитов использовали оценку сывороточного цитокинового профиля с помощью коммерческих ИФА-наборов фирмы Bender Med System на следующие цитокины: IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-17, IL-12, IL-12p40, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ .

Содержание ЛПВП в комплексе с холестерином определяли в плазме крови на биохимическом анализаторе Humalyzer Junior после предварительной преципитации ЛПНП и ЛПОНП [22]. Уровень окисленных

ЛПНП оценивали по содержанию малонового диальдегида (ТБК-реактивных продуктов) во фракции ЛПНП плазмы крови [33]. Множественно модифицированные ЛПНП в сыворотке определяли методом турбидиметрии при 450 нм после добавления поливинилпирролидоном-12600 [9]. Содержание С-реактивного белка определяли с использованием коммерческого ИФА набора фирмы Bender Med System.

Был проведен корреляционный анализ (пакет статистических анализов Excel 2003) связи перечисленных показателей с различными маркерами воспалительной и фиброзной патологии печени.

### Результаты и их обсуждение

Исследование активности эктонуклеотидаз (табл. 1) показало, что у больных АБП достоверно повышается (в 2,08—2,77 раза) по сравнению с группой здоровых лиц цитохимический индекс лимфоцитов, окрашивающихся одновременно на оба фермента (т.е. Трег-клеток), однако, параллельно с этим, но значительно более заметно (в 14,7—138 раз) увеличивается индекс лимфоцитов с высокой активностью NTDP на фоне отсутствия 5'-NT (клетки памяти с Тх17-потенциалом) и соответственно отношение Тх17/Трег (в 5,8—32,2 раза).

Факт увеличения у больных АБП как Трег, так и Тх17-клеток подтверждают и результаты исследования уровня цитокинов, ассоциированных с этими клетками (табл. 2): IL-10 — продуцируемого Трег клетками, IL-23 — вызывающего экспансию Тх17 клеток (уровень IL-23 оценивался нами по разнице между концентрацией субъединицы р40, входящей в состав цитокинов IL-12 и IL-23, и концентрацией IL-12), и двух цитокинов, секретируемых Тх17-клетками — IL-17 и IL-8. Концентрация всех перечисленных цитокинов достоверно возрастала у больных АБП и обнаруживала положительную корреляцию с Трег клетками — для IL-10, а для IL-23, IL-17 и IL-8 — с Тх17 клетками и клетками-эффекторами Тх17-воспаления (нейтрофилами и базофилами).

Тх17 клетки — единственная популяция иммунных клеток, резистентная к контролю со стороны Трег клеток, чем и объясняется более тяжелое течение воспаления Тх17-типа по сравнению с воспалением Тх1-типа. Продуцируемый Трег клетками IL-10 эффективно подавляет избыточную продукцию, а также функцию провоспалительных цитокинов Тх1-класса, в частности  $\gamma$ -IFN, но не способен блокировать IL-17 [25]. Более того, Трег клетки могут повышать синтез IL-17, превращаясь в Тх17 клетки в условиях высокой концентрации IL-1 $\beta$ , IL-23 и IL-6 [11, 40, 62]. Следует также отметить, что циркулирующим в крови Тх17 клеткам свойственно аккумулироваться в печени, причем накопление их там прямо коррелирует с лабораторными критериями тяжести повреждения печени, в отличие от цитотоксических CD8+ лимфоцитов, эффекторов Тх1-воспаления [47].

В литературе имеются сообщения о том, что в формирование дисбаланса Тх17/Трег могут вносить вклад окисленные липопротеины низкой плотности (окЛПНП): инкубация мононуклеаров здоровых людей с окЛПНП приводила к достоверному дозо- и время-зависимому снижению Трег и повышению Тх17 клеток [37]. В связи с этим представляло интерес исследование сывороточного липопротеинового статуса у больных АБП: окисленных или иным путем модифицированных ЛПНП, а также ЛПВП, способных, благодаря входящему в их состав антиокислительному ферменту параоксаназе, удалять окисленные липиды из ЛПНП [13]. ЛПВП, с их противовоспалительным, антиинфекционным, ангиопоглотическим, антитромбозным эффектами [14, 15, 17, 26, 28, 36], вообще принадлежит, наряду с Трег клетками, одно из центральных мест в системе механизмов, ограничивающих воспалительную реакцию на эндотоксин. Помимо измерения сывороточных липопротеинов, мы провели также цитохимическое определение уровня внутриклеточных липидов в моноцитах крови, поскольку моноциты/макрофаги участвуют в регуляции

Таблица 1  
Оценка различных популяций эктонуклеотидазо-положительных лимфоцитов (по среднему цитохимическому индексу) у больных АБП в сравнении со здоровыми лицами

	Кол-во обследований	Т-рег (NTDP+/5'-NT+)	Т-акт (NTDP-/5'-NT+)	Тх17 (NTDP+/5'-NT-)	Тх17/Трег
Здоровые	14	0,13+/-0,05	0,33+/-0,07	0,015+/-0,01	0,05+/-0,03
АГ	29	0,29+/-0,11	0,31+/-0,08	0,22+/-0,10*	0,29+/-0,18*
АЦП	63	0,36+/-0,06**	0,18+/-0,04*	2,07+/-0,66***/#	1,61+/-0,66**/#
АЦП + ОАГ	46	0,27+/-0,10	0,20+/-0,05	0,28+/-0,10**	1,58+/-0,78*

Примечание. АГ — больные алкогольным гепатитом; АЦП — больные алкогольным циррозом печени; АЦП + ОАГ — больные с острой атакой гепатита на фоне алкогольного цирроза; Т-рег — Т-регуляторные лимфоциты (с активностью обеих нуклеотидаз); Т-акт — активированные Т-лимфоциты (высокая активность 5'-NT на фоне отсутствия NTDP); Тх17 — клетки памяти с Тх17-потенциалом (высокая активность NTDP на фоне отсутствия 5'-NT); \* (\*\*\*) — разная степень достоверности (от  $\leq 0,05$  до  $\leq 0,001$ ) различий показателей больных в сравнении с группой здоровых лиц; # (#) — достоверность различий между группами больных с разной тяжестью заболевания

уровня липидов в микроокружении, активно захватывая окЛПНП своими ловушечными рецепторами, что может приводить к образованию вакуолизованных и «пенистых» клеток [27, 49].

Результаты, представленные в табл. 3, действительно выявили повышенное поступление липидов в моноциты с образованием вакуолизованных и даже единичных истинных «пенистых» клеток и достоверное нарушение липопротеинового профиля у больных АБП. Примечательно, что снижение ЛПВП, обладающих противовоспалительным потенциалом, с одновременным повышением окисленных и множественно модифицированных ЛПНП (как свободных, так и входящих в состав циркулирующих иммунных комплексов), характеризующихся провоспалительными эффектами, отмечалось уже у больных алкоголизмом, еще не имеющих клинических и даже лабораторных признаков повреждения печени. Это позволит предположить инициирующую роль сдвигов липопротеинового обмена в формировании иммуноопосредованной патологии печени у больных алкоголизмом, тем более что внутриклеточные липиды через особые ядерные рецепторы (PPAR) участвуют в переключении фенотипов макрофагов [27], а поступление липидов в макрофаги регулируется различными поверхностными рецепторами, также влияющими на фенотипическую поляризацию макрофагов. Так, рецеп-

тор SR-B1, связываясь с ЛПВП, поддерживает регуляторный фенотип моноцитов/макрофагов с высокой фагоцитарной активностью, обеспечивающей антиинфекционную защиту организма и своевременное удаление апоптотических клеток (эффероцитоз), с эффективной антиген-презентирующей способностью, и с продукцией большого количества регуляторного цитокина IL-10 [15]. Как можно видеть из табл. 2, концентрация сывороточного IL-10 действительно повышена у больных АБП, однако она не коррелирует с количеством моноцитов, которые, очевидно, не принадлежат к регуляторному фенотипу. Окисленные и множественно модифицированные ЛПНП распознаются другими типами рецепторов (CD36, CD68, SR-A, LOX), которые переключают макрофаги или по так называемому классическому пути активации на M1 или воспалительный фенотип [59], или по альтернативному пути активации на M2-фенотип [46, 54].

Воспалительный фенотип характеризуется высокой продукцией провоспалительных цитокинов, а также провоспалительных медиаторов, прежде всего активных форм кислорода и азота (АФК и АФА) за счет резкой активации НАДФН-оксидазы и индуцибельной NO-синтазы (NOS). АФК и АФА эффективно убивают инфекционные микроорганизмы, но могут повреждать и собственные ткани организма.

Таблица 2

Цитокины, индуцирующие Трег и Тх17-популяции лимфоцитов или синтезируемые этими популяциями лимфоцитов, у больных АБП в сравнении со здоровыми лицами

Цитокины		Здоровые	АГ	АЦП	АЦП + ОАГ
IL-10	М+/-m	1,14+/-0,36	3,04+/-0,82	4,05+/-0,71	9,43+/-3,87
	Корреляция		С Тх г=0,37*	С Трег г=0,39**	С Такт г=0,30*
IL-17	М+/-m	0,3+/-0,13	0,77+/-0,38	1,23+/-0,45	1,53+/-0,89
	Корреляция		С Тх17 г=0,37*; с нейтрофилами г=0,38*; с токсогенной зернистостью г=0,41**	С Тх17 г=0,34**; с апоптозом Т лимфоцитов г=0,25*	С Тх17 г=0,39**
IL-6	М+/-m	0+/-0	7,88+/-3,05	22,42+/-3,38	29,55+/-7,59
	Корреляция		С апоптозом Т лимфоцитов г=0,48**	С базофилами г=0,31*; с моноцитами г=0,32*	С апоптозом Т лимфоцитов г=0,39**
P40 — IL-12	М+/-m		20,2+/-5,72	49,9+/-23,53	22,0+/-15,73
	Корреляция		С Тх17 г=0,48**; с апоптозом Т лимфоцитов г=0,36*; с базофилами	С Тх17 г=0,33**; с токсогенной зернистостью г=0,31*; с базофилами г=0,38**	С Тх17 г=0,42***
IL-8	М+/-m	0+/-0	14,57+/-6,44	69,88+/-22,93	29*6,57+/-41,9
	Корреляция		С Тх17 г=0,30*	С Тх17 г=0,48**; с токсогенной зернистостью г=0,33*; с IL-17 г=0,41*; с P40 — IL-12 г=0,51***	С Тх17 г=0,53***; с нейтрофилами г=0,44**; с P40 — IL-12 г=0,52***

Примечание. АГ — больные алкогольным гепатитом; АЦП — больные алкогольным циррозом печени; АЦП + ОАГ — больные с острой атакой гепатита на фоне алкогольного цирроза; R — коэффициент корреляции Пирсона; \* (\*\*\*) — обозначена достоверность корреляции с разной степенью значимости



Альтернативно активированный фенотип включает в себя несколько подтипов, различающихся между собой по профилю синтезируемых цитокинов, но объединяемых общей особенностью метаболизма: переключением их аргининового обмена на аргиназный путь с образованием орнитина и продуктов его последующего превращения и результирующим блокированием NOS, конкурирующей с аргиназой за общий субстрат. Эта особенность метаболизма имеет несколько важных последствий. Образующиеся при дальнейшем катаболизме орнитина полиамины подавляют клональную экспансию лимфоцитов, приводя к их дефициту [18, 45], а параллельно образующиеся пролины используются в синтезе коллагена 1 и 3, фибронектина и других белков экстраклеточного матрикса, участвующих в фиброгенезе [10, 12, 63]. Блокирование же NOS приводит к резкому угнетению фагоцитоза, особенно эффероцитоза, и антиген-представляющей способности [45].

Таким образом, активность NOS в моноцитах/макрофагах может служить критерием идентификации их фенотипов, тем более, что идентификация макрофагов по поверхностным CD-маркерам, в отличие от Т-лимфоцитов, считается многими авторами проблематичной из-за способности макрофагов к

очень быстрому переключению фенотипов в ответ на меняющиеся стимулы микроокружения, вследствие чего CD-маркеры предшествующего фенотипа могут сохраняться уже после того, как клетки переключились на новый фенотип [18, 45].

Исследование гистохимического маркера NOS показало, что среди больных АБП лишь небольшой процент лиц имеет нормальный уровень NOS в моноцитах (не более 7%), 25% больных АБП имеют в среднем вдвое сниженный по сравнению с группой здоровых лиц уровень моноцитарной NOS и 68% больных — в 2,5 раза более высокий, чем в норме, уровень NOS моноцитов. При этом в группе больных с доминированием NOS-дефицитного фенотипа моноцитов (NOS<sup>-</sup>M) более высока доля лиц с АЦП, тогда как в группе с NOS-гиперактивным фенотипом моноцитов (NOS<sup>+</sup>M) более высока доля лиц с АГ и АЦП + ОАГ, т.е. с выраженным воспалительным компонентом (табл. 4). Это вполне согласуется с данными литературы о преимущественном функционировании NOS<sup>-</sup>M-фенотипа в качестве фиброгенной клетки, а NOS<sup>+</sup>M — как воспалительной клетки. Группа больных АБП с NOS<sup>-</sup>M-фенотипом отличается также более высокой частотой летальных исходов.

Таблица 3

Липопротеины сыворотки и внутриклеточные липиды моноцитов у больных АБП в сравнении со здоровыми лицами и больными алкоголизмом без АБП

	Здоровые	Больные алкоголизмом без клинически выраженной патологии печени		Больные АБП		
		Нормальный уровень АЛТ и АСТ	Повышенный уровень АЛТ и АСТ	АГ	АЦП	АЦП + ОАГ
ЛПВП (мг/дл)	71,45+/-5,31	50,29+/-7,18**	39,49+/-6,51***	38,32+/-3,72***	27,31+/-2,98***/#	19,38+/-2,22***/#
окЛПНП (нМ/мл)	1,56+/-0,19	—	3,85 +/-0,95**	—	4,01+/-0,47**	—
ммЛПНП (усл. ед.)	4,52+/-0,66	13,00+/-1,03***	18,07+/-2,09***/#	26,51+/-7,21***	11,01+/-1,70***/#	18,81+/-3,58***/#
Холестеринсодержащие иммунные комплексы	18,05+/-6,94	—	—	57,98+/-19,01*	25,67+/-6,31	49,05+/-13,80*
% моноцитов, перегруженных липидами	1,5+/-2,2	—	—	10,2+/-2,1**	34,2+/-7,26***/###	15,02+/-1,8 ***/##
% вакуолизованных моноцитов	0,7+/-0,02	—	—	32,67+/-5,84***	47,29+/-7,48***	71,56+/-12,2***
% лиц с единичными "пенистыми" моноцитами	0	0	0	0	2,26	4,63

Примечание. Обозначения те же, что и в табл. 1.

Таблица 4

Сравнительная частота различных форм АБП и летальных случаев у больных с различными фенотипами моноцитов/макрофагов

	NOS-дефицитные макрофаги	NOS-гиперактивные макрофаги
АГ	14,4%	18,1%
АЦП	63,5%	52,7%
АЦП + ОАГ	22,1%	29,2%
Летальность	8,4%	4,6

Сравнение цитокинового профиля больных с разными фенотипами моноцитов (табл. 5) выявило одинаковую степень гиперпродукции провоспалительных цитокинов, в том числе цитокинов, ассоциированных с T<sub>H</sub>17 клетками: IL-17, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8. Это свидетельствует в пользу участия обоих фенотипов моноцитов/макрофагов в индукции T<sub>H</sub>17-типа воспаления у больных АБП. В качестве индикаторов T<sub>H</sub>17- или T<sub>H</sub>1-типа реакций в литературе часто используют индексы IL-1 $\beta$ /IL-12 и IL-12/IL-10 [40]: высокий индекс IL-1 $\beta$ /IL-12 и низкий индекс IL-12/IL-10 служат показателями T<sub>H</sub>17-направленности, тогда как высокий индекс IL-12/IL-10 указывает на T<sub>H</sub>1-реакцию. У больных с NOS<sup>+</sup> фенотипом оба индекса достоверно превышают норму, свидетельствуя о смешанном типе воспаления — T<sub>H</sub>17/T<sub>H</sub>1. Более высокий уровень СРБ (С-реактивного белка) у больных с NOS<sup>+</sup> фенотипом согласуется со способностью СРБ образовывать комплексы с окЛПНП и переключать дифференциацию макрофагов на воспалительный фенотип [21, 42]. Выявленная нами гиперпродукция провоспалительных цитокинов у больных с NOS-дефицитным фенотипом моноцитов, скорее всего, указывает на подтип описанный в работах [35, 41, 45], который предположительно индуцируется рецепторами к эндотоксину (CD4 и TLR4).

Сдвиги иммуноклеточного статуса у больных с разными фенотипами моноцитов/макрофагов носят в целом однотипный характер (табл. 6), а имеющиеся отличия вполне укладываются в рамки функциональных особенностей доминирующих макрофагальных фенотипов. Так, более выраженный лейкоцитоз и нейтрофи-

лия у больных с NOS-дефицитным фенотипом согласуются со способностью полиаминов и пролинов, синтезируемых в ходе аргиназного метаболизма аргинина, повышать пролиферативную активность [53, 63], а усиленный апоптоз Т-лимфоцитов — присутствием в этой популяции макрофагов индоламин-2,3-диоксигеназы, генерирующей метаболиты триптофана с высокой способностью вызывать апоптоз Т-лимфоцитов [19, 56]. С другой стороны, высокий процент нейтрофилов с токсогенной зернистостью у больных с NOS-гиперактивным фенотипом моноцитов вполне согласуется с воспалительной функцией этого фенотипа, так как появление крупной зернистости служит показателем усиленного экзоцитоза нейтрофилов с освобождением большого количества воспалительных цитокинов и медиаторов [60, 61].

Принимая во внимание сообщения о различной плотности на NOS-дефицитных и NOS-гиперактивных макрофагах рецепторов к эндотоксину [65], мы провели сравнительный анализ корреляционных связей иммуноклеточных, иммунохимических и некоторых клинических параметров с уровнем эндотоксина у больных АБП с различными фенотипами моноцитов. Полученные результаты (табл. 7) показали, что у больных с NOS-дефицитной поляризацией моноцитов большинство сдвигов положительно и высоко достоверно коррелирует с уровнем эндотоксина, тогда как у больных с NOS-гиперактивным фенотипом корреляцию с эндотоксином обнаружила лишь небольшая часть показателей, в основном цитокины T<sub>H</sub>17-класса. В то же время анализ связей тех же показателей с уровнем окЛПНП

Таблица 5

Цитокиновый профиль у больных АБП с NOS-дефицитным (NOS<sup>-</sup>) и NOS-гиперактивным (NOS<sup>+</sup>) фенотипами моноцитов

	Норма	АБП	
		NOS <sup>-</sup>	NOS <sup>+</sup>
IL-1 $\beta$	123+/-12	364+/-115*	386,2+/-127* —
IL-17	0,3+/-0,11	0,82+/-0,21*	1,25+/-0,27***
P40	62,4+/-5,5	100+/-13,53**	123,9+/-8,76***
IL-12	31,8+/-8,1	88,5+/-21,41**	114+/-15,8***
IL-6	0+/-0	22,78+/-5,48***	18,4+/-3,13***
IL-8	0+/-0	108,6+/-42,1**	141,4+/-20,9***
TNF $\alpha$	2.25+/-0,11	12,2+/-2,22***	12,5+/-0,81***
СРБ	381+/-114	825,8+/-145**	1732,7+/-157***/###
IL-4	25,0+/-4,7	13,3+/-2,87*	32,0+/-8,20#
IL-10	1,14+/-0,36	5,01+/-1,03***	4,98+/-1,16***
TGF $\beta$ 1	808+/-31	277,4+/-66,2***	159,5+/-24,21***
IL-1 $\beta$ /IL-12	3,27+/-0,23	3,41+/-0,74	6,94+/-1,66**/#
IL-12/IL-10	27,89+/-0,88	34,6+/-5,45	59,15+/-11,27**/#

Примечание. \* (\*\*\*) — достоверность различий в сравнении с группой здоровых лиц; # (##) — достоверность различий между больными с разными фенотипами моноцитов

или ммЛПНП (табл. 8) выявил прямо противоположную картину: достоверную положительную корреляцию с ммЛПНП большинства сдвигов у больных с NOS-гиперактивным фенотипом и практически отсутствие корреляции с ммЛПНП у больных с NOS-дефицитной поляризацией.

Полученные данные дают основание дополнить существующую гипотезу эндотоксиновой агрессии как патогенетического механизма АБП предположением о роли

«двойного удара» в формировании и прогрессировании АБП: эндотоксинемии, реакция на которую опосредуется главным образом альтернативно активированными (или NOS-дефицитным) фенотипом макрофагов, и гиперпродукции ммЛПНП, индуцирующей воспалительную (или NOS-гиперактивную) поляризацию макрофагов. При этом и в той и в другой реакции существенную роль играет дисбаланс Tх17/Трег клеток.

Таблица 6

Сравнение иммуноклеточного статуса у больных с разными фенотипами моноцитов/макрофагов

	Здоровые	АГ		АЦП		АЦП + ОАГ	
		NOS <sup>-</sup>	NOS <sup>+</sup>	NOS <sup>-</sup>	NOS <sup>+</sup>	NOS <sup>-</sup>	NOS <sup>+</sup>
Лейкоциты (тыс.)	6,33+/-0,31	9,94+/-0,58***	6,77+/-0,38###	7,74+/-0,73	5,49+/-0,35##	13,04+/-2,62**	10,49+/-0,98***
Лимфоциты (тыс./мкл)	2,16+/-0,11	2,26+/-0,57	1,81+/-0,18	1,61+/-0,14***	1,29+/-0,06***/#	1,26+/-0,29***	1,40+/-0,11***
CD3+ (тыс./мкл)	1,56+/-0,10	1,65+/-0,45	1,40+/-0,17	1,18+/-0,10**	1,01+/-0,05***	0,98+/-0,21**	1,09+/-0,12***
CD4+ (тыс./мкл)	0,93+/-0,08	0,62+/-0,14*	0,81+/-0,12	0,69+/-0,07*	0,59+/-0,03***	0,59+/-0,11**	0,70+/-0,09*
Трег (цитохимический индекс)	0,13+/-0,04	0,44+/-0,12**	0,15+/-0,07#	0,20+/-0,07	0,31+/-0,11	0,13+/-0,07	0,07+/-0,03
Tх17 (цитохимический индекс)	0,02+/-0,01	0,01+/-0,01	0,12+/-0,08	0,29+/-0,08***	0,13+/-0,04**	0,22+/-0,09**	0,33+/-0,10***
Tх17/Трег	0,05+/-0,04	0,01+/-0,01	0,24+/-0,14	5,73+/-0,98***	2,39+/-0,55***/#	1,04+/-0,49*	2,55+/-0,54***/#
CD8+ (тыс./мкл)	0,63+/-0,07	0,62+/-0,16	0,56+/-0,08	0,38+/-0,05**	0,36+/-0,02***	0,31+/-0,11**	0,40+/-0,06**
CD95++ (тыс./мкл)	0+/-0	0,40+/-0,18**	0+/-0#	0,75+/-0,28**	0+/-0#	0+/-01	0+/-0
CD19+ (тыс./мкл)	0,24+/-0,02	0,19+/-0,06	0,14+/-0,11	0,11+/-0,01***	0,08+/-0,0058***/#	0,14+/-0,05	0,12+/-0,01**
НК (тыс./мкл)	0,18+/-0,02	0,19+/-0,06	0,12+/-0,01**	0,11+/-0,02**	0,22+/-0,12	0,07+/-0,02***	0,10+/-0,01***
НКТ (тыс./мкл)	0,10+/-0,01	0,05+/-0,01***	0,08+/-0,01#	0,06+/-**	0,07+/-0,008*	0,05+/-0,02***	0,05+/-0,01***
Нейтрофилы (тыс./мкл)	3,6+/-0,27	6,38+/-0,3***	4,19+/-0,336###	5,06+/-0,55**	3,73+/-0,33#	11,19+/-2,37***	8,63+/-0,82***
Токсогенные (%)	0,69+/-0,21	3,3+/-2,15	4,12+/-2,25	10,75+/-3,11**	20,63+/-3,48***/#	2,38+/-2,37	34,61+/-5,38***/###
Эозинофилы (тыс./мкл)	0,15+/-0,03	0,13+/-0,04	0,15+/-0,02	0,2+/-0,05	0,09+/-0,01###	0,23+/-0,09	0,24+/-0,05
Базофилы (тыс./мкл)	0,02+/-0,02	0,01+/-0,01	0,02+/-0,01	0,02+/-0,01	0,02+/-0,003	0,14+/-0,07	0,04+/-0,01
Моноциты (тыс./мкл)	0,44+/-0,07	1,16+/-0,11***	0,67+/-0,09*/###	0,59+/-0,08	0,46+/-0,04	0,45+/-0,09	0,67+/-0,07**/#
Вакуолизированные (%)	0,7+/-0,05	30,56+/-6,71***	32,67+/-5,84***	52,36+/-8,36***	42,01+/-7,48***	85,71+/-8,72***	57,41+/-24,4**
Пенистые (%)	0	0	0	13,3	21,05	0	33,3
Лейкоцитарный индекс интоксикации	0,59+/-0,09	1,09+/-0,28	0,88+/-0,12	1,70+/-0,42***	1,73+/-0,3***	5,19+/-1,93**	3,30+/-0,58***

Примечание. \* (\*\*), # (\*\*), ## (\*\*), ### (\*\*\*) — достоверность различий в сравнении с группой здоровых лиц; # (\*\*), ## (\*\*), ### (\*\*\*) — достоверность различий между больными с одной и той же выраженностью патологии печени, но с разными фенотипами моноцитов

Корреляция различных иммуноклеточных, иммунохимических, биохимических и клинических показателей с уровнем эндотоксина у больных с доминированием различных фенотипов моноцитов

NOS-дефицитный фенотип моноцитов	NOS-гиперактивный фенотип моноцитов
Дефицит Т-лимфоцитов, $r=0,64^*$	
Повышение NK, $r=0,85^{**}$	
Увеличение Tх17/Трег, $r=0,81^{**}$	
Гиперактивность нейтрофилов, $r=0,86^{**}$	
TGF $\beta$ -2, $r=0,79^{**}$	
IL-10, $r=0,65^*$	IL-10, $r=0,55^{**}$
IL-17, $r=0,81^{**}$	IL-17, $r=0,58^{**}$
p40- IL-12(IL-23), $r=0,79^{**}$	p40- (IL-12), $r=0,61^{**}$
IL-6, $r=0,76^{**}$	IL-6, $r=0,43^*$
IL-8, $r=0,78^{**}$	IL-8, $r=0,57^{**}$
TNF- $\alpha$ , $r=0,80^{**}$	
МНО, $r=0,87^{**}$	
ммЛПНП, $r=0,84^{**}$	
Индекс Чайльд-Пью, $r=0,82^{**}$	
Энцефалопатия, $r=0,86^{**}$	
Прогрессирование болезни, $r=0,63^*$	
Летальность, $r=0,78^{**}$	

Примечание. R — коэффициент корреляции Пирсона между указанным в графе показателем и уровнем эндотоксина; \* (\*\*), — достоверность корреляции с разной степенью значимости (от  $\leq 0,05$  до  $\leq 0,001$ )

Корреляция различных иммуноклеточных, иммунохимических, биохимических и клинических показателей с уровнем множественно модифицированных ЛНП у больных с доминированием различных фенотипов моноцитов

NOS-дефицитный фенотип моноцитов	NOS-гиперактивный -фенотип моноцитов
IL-8, $r=0,41^*$	Повышение Т-активированных клеток $r=0,57^{***}$
Энцефалопатия, $r=0,65^{**}$	Повышение NK, $r=0,57^{***}$
	Повышение цитотоксических Т-лимфоцитов
	Нейтрофилез, $r=0,56^{***}$
	Индекс незрелости нейтрофилов, $r=0,61^{***}$
	Повышение количества моноцитов, $r=0,55^{***}$
	Вакуолизация моноцитов, $r=0,86^{**}$
	Аккумуляция липидов в моноцитах, $r=0,56^{***}$
	ЛИИ, $r=0,34^{**}$
	Увеличение Tх17/Трег, $r=0,48^{***}$
	IL-10, $r=0,42^{***}$
	IL-17, $r=0,43^{***}$
	Гиперактивность NO-синтазы моноцитов
	АЛТ, $r=0,44^{***}$
	Индекс Чайльд-Пью $r=0,56^{***}$
	Прогрессирование болезни, $r=0,42^{**}$
	Летальность $r=0,29^*$

Примечание. R — коэффициент корреляции Пирсона между указанным в графе показателем и уровнем множественно модифицированных ЛПНП; \* (\*\*), — достоверность корреляции с разной степенью значимости (от  $\leq 0,05$  до  $\leq 0,001$ )

### Заключение

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что в иницировании и прогрессировании АБП важную роль играют нарушения основных механизмов, контролируемых в норме реакцию на эндотоксин и поддерживающих толерогенный фенотип макрофагов (клеток Купфера печени), обеспечивающий подпороговый уровень активации. Эти нарушения включают дефицит Т-регуляторного звена иммунитета, дисбаланс Т-регуляторных и Тх17 клеток, недостаточность компонентов плазмы, блокирующих воспалительную активность эндотоксина (прежде всего, липопротеинов высокой плотности) и гиперпродукцию компонентов, стимулирующих переключение макрофагов с толерогенного фенотипа на воспалительный и альтернативно активированный или фиброзогенный фенотипы (интенсивно окисленных и множественно модифицированных липопротеинов низкой плотности).

Коррекция регуляторных механизмов, ограничивающих патологическую реакцию на эндотоксин и окЛПНП, должна рассматриваться как необходимая мишень терапевтической стратегии в клинике АБП. С целью коррекции дисбаланса Тх17/Трег-клеток может быть рекомендовано назначение иммуномодуляторов, например, отечественного галавита, способного также переключать макрофаги с воспалительного фенотипа на толерогенный [3]. В зарубежной литературе упоминаются также некоторые растительные, специфические для Трег-клеток, иммуномодуляторы, такие, как *Artemisia annua*, экстракты флавоноидов из *Fructus Chorspondiatidis* и ряд других [34, 38], лиганды ядерных РРАУ-рецепторов, вызывающих переключение дифференциации незрелых Т хелперов с патогенного Тх17-фенотипа на Трег-фенотип (розиглитазон и пиоглитазон) [52]. В состав РРАУ-рецепторов входит также X-ретиноидный рецептор, лиганды которого, например лекарственный препарат all-trans ретиноевой кислоты — третиноин  $C_{20}H_{28}O_2$ , также предложены для коррекции Тх17/Трег-дисбаланса [16, 30]. С учетом упомянутого дисбаланса требует большей осторожности назначение больным АБП анти-TNF $\alpha$  терапии, способной приводить к блокированию на Трег клетках рецепторов к TNF $\alpha$ , отвечающих за их пролиферацию. Кроме того, анти-TNF $\alpha$  терапия повышает вероятность переключения макрофагов на более патогенный в сравнении с воспалительными макрофагами NOS-дефицитный фенотип, так как TNF $\alpha$  является одним из мощных стимуляторов индуцибельной NOS.

Корректоры уровня ЛПВП также могут найти место в арсенале средств для лечения АБП. Показано, в частности, что статины, нормализуя уровень ЛПВП, одновременно способны повышать количество Трег-клеток и усиливать их функции [44, 52], а также регулировать

уровень С-реактивного белка [50]. Нормализация уровня ЛПВП, содержащих в своем составе антиоксидательный фермент параоксаназу, способствует одновременно снижению уровня окЛПНП. С целью предотвращения чрезмерного окисления ЛПНП возможно также дополнительное применение антиоксидантов. Однако назначение антиоксидантов требует предварительного определения доминирующей у больного поляризации макрофагов, так как антиоксиданты могут быть эффективны при NOS-гиперактивной поляризации и в то же время не только бесполезны, но и вредны при NOS-дефицитной поляризации. Показано, что антиоксиданты способны частично блокировать только цитотоксический эффект окЛПНП (т.е. воспалительную патологию печени), повышая в то же время синтез коллагена и пролиферативный статус клеток, участвующих в фиброгенезе [53, 54]. Описано также успешное применение витамина  $1,25(OH)_2D_3$  для снижения окисленных ЛПНП, для усиления дифференцировки макрофагов в толерогенный фенотип, повышения количества Трег-клеток и супрессии Тх17-реакций [32, 48]. Разработан ряд низкомолекулярных ингибиторов сигнальных каскадов, участвующих в захвате макрофагами окЛПНП [24, 64].

Дефицит NO-синтазы моноцитов создает высокий риск развития аутоиммунных реакций из-за нарушения своевременного удаления макрофагами апоптотических клеток, опосредуемого NO-синтазой, и потому может служить показанием к назначению больным доноров оксида азота.

Работа выполнена при поддержке гранта РГНФ №10-06-00719а.

### Список литературы

1. Голиков П.П., Николаева Н.Ю. Метод определения нитритов/нитратов ( $NO_x$ ) в сыворотке крови // Биомед. Химия. — 2004. — Т. 50, №1. — С. 79—85.
2. Кононский А.И. Гистохимия. — Киев: Издательское объединение «Вища школа», 1976. — 278 с.
3. Латышева Т.В., Щербакова О.А. Новые возможности направленной иммунологической коррекции на примере отечественного иммуномодулятора «галавит» // Российск. Аллергогол. ж. — 2004. — №1. — С. 77—80.
4. Ллойда З., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы / Пер. с англ. — М.: Мир, 1982. — 270 с.
5. Панченко Л.Ф., Пирожков С.В., Наумова Т.А. и др. Иммуноклеточный статус и выраженность эндотоксинемии у больных алкоголизмом с различной степенью алкогольного поражения печени // Наркология. — 2008. — Т. 82, №10. — С. 42—48.
6. Панченко Л.Ф., Пирожков С.В., Наумова Т.А. и др. Эндотоксинемия, генерация цитокинов и интенсивность перекисного окисления липидов у больных алкогольной зависимостью с поражением печени различной тяжести // Вопросы наркологии. — 2009. — №2. — С. 39—48.

7. **Панченко Л.Ф., Огурцов П.П., Пирожков С.В.** и др. Печеночная недостаточность и медиаторы воспалительного ответа при алкогольной болезни печени и кардиомиопатии. Эффект пентоксифиллина // Наркология. — 2011. — Т. 114, №6. — С. 47—55.
8. **Панченко Л.Ф., Пирожков С.В., Теребиллина Н.Н.** и др. Механизмы антиэндоксиновой защиты печени. Обзор современных данных // Патол. физиол. и эксперим. терапия. — 2012 (в печати).
9. **Шойбонов Б.Б., Баронец В.Ю., Панченко Л.Ф.** и др. Среда и способ определения множественно модифицированных липопротеинов сыворотки крови человека. Патент РФ №2444014. С.1. Опубликовано 27.02.2012. Бюлл. №6.
10. **Albina J.E., Mills C.D., Henry W.L., Caldwell M.D.** Temporal expression of different pathways of l-arginine metabolism in healing wounds // J. Immunol. — 1990. — Vol. 144. — P. 3877—3880.
11. **Ayyoub M., Deknuydt F., Raimbaud I.** et al. Human memory FOXP3+ Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the T(H)17 lineage-specific transcription factor RORgamma t // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2009. — №106. — P. 8635—8640.
12. **Bellin T., Martinez V., Lucendo B.** et al. Alternative activation of macrophages in human peritoneum: implications for peritoneal fibrosis // Nephrol. Dial. Transplant. — 2011. — Vol. 26, №9. — P. 2995—3005.
13. **Bergmark C., Dewan A., Orsoni A.** et al. A novel function of lipoprotein [a] as a preferential carrier of oxidized phospholipids in human plasma // J. Lipid Res. — 2008. — Vol. 49. — P. 2230—2240.
14. **Birjmohun R.S., van Leuven S.I., Levels J.H.** et al. High-density lipoprotein attenuates inflammation and coagulation response on endotoxin challenge in humans // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2007. — Vol. 27. — P. 1153—1158.
15. **Cai L., Ji A., de Beer F.C.** et al. SR-BI protects against endotoxemia in mice through its roles in glucocorticoid production and hepatic clearance // J. Clin. Invest. — 2008. — Vol. 118, №1. — P. 364—375.
16. **Cassani B., Villablanca E.J., De Calisto J.** et al. Vitamin A and immune regulation: Role of retinoic acid in gut-associated dendritic cell education, immune protection and tolerance // Mol. Aspects Med. — 2011. — Vol. 33, №1. — P. 63—76.
17. **Cho K.-H.** Biomedical implications of high-density lipoprotein: its composition, structure, functions, and clinical applications // BMB reports. — 2009. — Vol. 42, №7. — P. 393—400.
18. **Cordeiro-da-Silva A., Tavares J., Araujo N.** et al. Immunological alterations induced by polyamine derivatives on murine splenocytes and human mononuclear cells // Int. Immunopharmacol. — 2004. — Vol. 4, №4. — P. 547—556.
19. **Darcy C.J., Davis J.S., Woodberry T.** et al. An observational cohort study of the kynurenine to tryptophan ratio in sepsis: association with impaired immune and microvascular function // PLoS One. — 2011. — Vol. 6, №6. — P. e21185.
20. **Deaglio S., Dwyer K.M., Gao W.** et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression // J. Exp. Med. — 2000. — Vol. 204, №6. — P. 1257—1265.
21. **Devaraj S., Jialal I.** C-reactive protein polarizes human macrophages to an M1 phenotype and inhibits transformation to the M2 phenotype // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2011. — Vol. 31, №6. — P. 1397—1402.
22. **Draeger B., Wahlefeld.** Development of the test for determination of HDL-cholesterol by precipitation / H. Greten, P.D. Lang, G. Schettler (Eds.). Lipoproteins and coronary heart disease. — N.Y. — Baden-Baden — Cologne: Gerhard Wittstock Publishing House, 1980. — 203 p. — P. 38—43.
23. **Dwyer K.M., Hanidziar D., Putheti P.** et al. Expression of CD39 by human peripheral blood CD4+ CD25+ T cells denotes a regulatory memory phenotype // Am. J. Transplant. — 2010. — Vol. 10, №11. — P. 2410—2420.
24. **Etzion Y., Hackett A., Proctor B.M.** et al. An unbiased chemical library screen identifies agents that modulate uptake of oxidized LDL by macrophages // Circul. Res. — 2009. — Vol. 105. — P. 148—157.
25. **Fletcher J.M., Lonergan R., Costelloe L.** et al. CD39+Foxp3+ regulatory T cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis // J. Immunol. — 2009. — Vol. 183, №11. — P. 7602—7610.
26. **Fukui H.** Relation of endotoxin, endotoxin binding proteins and macrophages to severe alcoholic liver injury and multiple organ failure // Alcohol. Clin. Exp. Res. — 2005. — Vol. 29. — (11 Suppl.). — P. 172S—179S.
27. **Gallardo-Soler A., Gomez-Nieto C., Campo M.L.** et al. Arginase I induction by modified lipoproteins in macrophages: A peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma/\delta$ -mediated effect that links lipid metabolism and immunity // Mol. Endocrin. — 2008. — Vol. 22, №6. — P. 1394—1402.
28. **Guo L., Song Z., Li M.** et al. Scavenger receptor BI protects against septic death through its role in modulating inflammatory response // J. Biol. Chem. — 2009. — Vol. 284, №30. — P. 1926—1934.
29. **Hesse M., Modolell M., La Flamme A.C.** et al. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines *in vivo*: granulomatous pathology is shaped by the pattern of l-arginine metabolism // J. Immunol. — 2001. — Vol. 167. — P. 6533—6544.
30. **Ichikawa S., Mucida D., Tyznik A.J.** et al. Hepatic stellate cells function as regulatory bystanders // J. Immunol. — 2011. — Vol. 186, №10. — P. 5549—5555.
31. **Kasmi K.C.E., Qualls J.E., Pesce J.T.** et al. Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens // Nat. Immunol. — 2008. — Vol. 9. — P. 1399—1406.
32. **Khoo A.-L., Koenen H.J.P., Chai L.Y.A.** et al. Seasonal variation in vitamin D<sub>3</sub> levels is paralleled by changes in the peripheral blood human T cell compartment // PLoS One. — 2012. — Vol. 7, №1. — P. e29250.
33. **Kikugawa K., Kojima T., Yamaki S., Kosugi H.** Interpretation of the thiobarbituric acid reactivity of rat liver and brain homogenates in the presence of ferric ion and ethylene-diamine-tetraacetic acid // Anal. Biochem. — 1992. — Vol. 202, №2. — P. 249—255.
34. **Kunz M., Ibrahim S.M.** Cytokines and cytokine profiles in human autoimmune diseases and animal models of autoimmunity // Mediators Inflamm. — 2009. Article ID 979258. — 20 p.
35. **Lefevre L., Gale A., Olagnier D.** et al. PPAR $\gamma$  ligands switched high fat diet-induced macrophage M2b polarization toward M2at thereby improving intestinal Candida elimination // PLoS ONE — 2010. — 5, №9. — P. e12828—12840.
36. **Levels J.H.M., Geurts P., Karlsson H.** et al. High-density lipoprotein proteome dynamics in human endotoxemia // Proteome Sci. — 2011. — Vol. 9. — P. 34.
37. **Li Q., Wang Y., Chen K.** et al. The role of oxidized low-density lipoprotein in breaking peripheral Th17/Treg balance in patients with acute coronary syndrome // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2010. — Vol. 394, №3. — P. 836—842.
38. **Li T., Chen H., Wei N.** et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of artemisinin on contact hypersensitivity // Int. Immunopharmacol. — 2012. — Vol. 12, №1. — P. 144—150.
39. **Lin J., Li M., Wang Z.** et al. The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in macrophage-derived foam-cell formation // J. Lipid Res. — 2010. — Vol. 51, №5. — P. 1208—1217.
40. **Lopez P., Gonzalez-Rodriguez I., Guemonde M.** et al. Immune Response to Bifidobacterium bifidum Strains Sup-

port Treg/Th17 Plasticity // PLoS One. — 2011. — Vol. 6, №9. — P. e24776.

41. *Mantovani A., Allavena P., Sozzani S.* et al. Chemokines in the recruitment and shaping of the leukocyte infiltrate of tumors // *Semin. Cancer Biol.* — 2004. — Vol. 14, №3. — P. 155–160.

42. *Matsumura E., Kobayashi K., Tabuchi M., Lopez L.R.* Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis // *Prog. Lipid Res.* — 2006. — Vol. 45, №6. — P. 466–486.

43. *Moncrieffe H., Nistala K., Kamhieh Y.* et al. High expression of the ectonucleotidase CD39 on T cells from the inflamed site identifies two distinct populations, one regulatory and one memory T cell population // *J. Immunol.* — 2010. — Vol. 185, №1. — P. 134–143.

44. *Mor A., Luboshits G., Planer D.* et al. Altered status of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in patients with acute coronary syndromes // *Eur. Heart J.* — 2006. — Vol. 27, №21. — P. 2530–2537.

45. *Mosser D.M., Edwards J.P.* Exploring the full spectrum of macrophage activation // *Nat. Rev. Immunol.* — 2008. — Vol. 8, №12. — P. 958–969.

46. *Nagy L., Tontonoz P., Alvarez J.G., Evans R.M.* Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma // *Cell.* — 1998. — Vol. 93. — P. 229–240.

47. *Niu Y., Liu H., Yin D.* et al. The balance between intrahepatic IL-17<sup>+</sup> T cells and Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells plays an important role in HBV-related end-stage liver disease // *BMC Immunol.* — 2011. — Vol. 12. — P. 47.

48. *Oh J., Weng S., Felton S.K.* et al. 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D inhibits foam cell formation and suppresses macrophage cholesterol uptake in patients with type 2 diabetes mellitus // *Circulation.* — 2009. — Vol. 120, №8. — P. 687–698.

49. *Prieur X., Mok C.Y.L., Velagapudi V.R.* et al. Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice // *Diabetes.* — 2011. — Vol. 60, №3. — P. 797–809.

50. *Rene R.S., Packard M.D., Lichtman A.H., Libby P.* Innate and adaptive immunity in atherosclerosis // *Semin. Immunopathol.* — 2009. — Vol. 31, №1. — P. 5–22.

51. *Resta R., Thompson L.F.* T cell signalling through CD73 // *Cell Signal.* — 1997. — Vol. 9, №2. — P. 131–139.

52. *Rockey D.C.* Current and future anti-fibrotic therapies for chronic liver disease // *Clin. Liver Dis.* — 2008. — Vol. 12, №4. — P. 939–xi.

53. *Ronis M.J.J., Hennings L., Stewart B.* et al. Effects of long-term ethanol administration in a rat total enteral nutrition model of alcoholic liver disease // *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* — 2011. — Vol. 300, №1. — P. G109–G119.

54. *Schneiderhan W., Schmid-Kotsas A., Zhao J.* et al. Oxidized low-density lipoproteins bind to the scavenger receptor, CD36, of hepatic stellate cells and stimulate extracellular matrix synthesis // *Hepatology.* — 2001. — Vol. 34, №4. — P. 729–737.

55. *Sekiya M., Jsuga J., Igarashi M.* et al. The role of neutral cholesterol ester hydrolysis in macrophage foam cells // *J. Atheroscler. Thromb.* — 2011. — Vol. 18, №5. — P. 359–364.

56. *Sekai D., Guttet O., Lemaire G.* et al. Inhibition of nitric oxide synthase expression and activity in macrophages by 3-hydroxyanthranilic acid, a tryptophan metabolite // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1997. — Vol. 340. — P. 117–123.

57. *Silber R., Conklyn M., Grusky G., Zucker-Franklin D.* Human lymphocytes: 5'-nucleotidase-positive and -negative // *J. Clin. Invest.* — 1975. — Vol. 56, №5. — P. 1324–1327.

58. *Svicky E., Ondraovic M., Danko J.* et al. Localisation of NADPH-diaphorase-positive structures in the thymus of the rat, mouse and rabbit // *Folia Morphol (Warsz.)*. — 2003. — Vol. 62, №3. — P. 167–170.

59. *Tidball J.G., Villalta S.A.* Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* — 2010. — Vol. 298, №5. — P. R1173–R1187.

60. *Trevani A.S., Andonegui G., Giordano M.* et al. Extracellular acidification induces human neutrophil activation // *J. Immunol.* — 1999. — Vol. 162. — P. 4849–4857.

61. *Uriarte S.M., Rane M.J., Luerman G.C.* et al. Granule exocytosis contributes to priming and activation of the human neutrophil respiratory burst // *J. Immunol.* — 2011. — Vol. 187, №1. — P. 391–400.

62. *Voo K.S., Wang Y.H., Santori F.R.* et al. Identification of IL-17-producing FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in humans // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2009. — Vol. 106, №4. — P. 793–798.

63. *Wu G., Morriss S.M.* Arginine metabolism: nitric oxide and beyond // *Biochem. J.* — 1998. — Vol. 336. — P. 1–17.

64. *Zingg J.M., Hasan S.T., Cowan D.* et al. Regulatory effects of curcumin on lipid accumulation in monocytes/macrophages // *J. Cell. Biochem.* — 2012. — Vol. 113, №3. — P. 833–840.

65. *Zou W., Borvak J., Marches F.* et al. Macrophage-derived dendritic cells have strong Th1-polarizing potential mediated by β-Chemokines rather than IL-12 // *J. Immunol.* — 2000. — Vol. 165. — P. 4388–4396.

Поступила 29.06.12

## Сведения об авторах:

*Панченко Леонид Федорович*, д-р мед. наук, проф., акад. РАМН, зав. лаб. биохимии ФГБУ «НИИОПП» РАМН, зав. лаб. биохимии ФГБУ «ННЦН» Минздрава РФ

*Пирожков Сергей Викторович*, д-р мед. наук, проф., каф. патофизиологии ФГБОУ ВПО «1-й МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава РФ, вед. науч. сотр. лаб. биохимии ФГБУ «ННЦН» Минздрава РФ

*Теребиллина Наталья Николаевна*, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. биохимии ФГБУ «ННЦН» Минздрава РФ

*Наумова Татьяна Александровна*, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. биохимии ФГБУ «ННЦН» Минздрава РФ

*Баронец Валерия Юрьевна*, ст. науч. сотр. лаб. биохимии ФГБУ «ННЦН» Минздрава РФ

*Мерзликина Н.Н.*, аспирант кафедры госпитальной терапии №2 ФГБОУ ВПО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава РФ

*Журавлева А.С.*, аспирант кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВПО «РУДН»

Д.С. Суханов<sup>1</sup>, Е.Б. Артюшкова<sup>2</sup>, В.Т. Дудка<sup>3</sup>

## ***Сравнительное гепато- и эндотелиопротективное действие растворов ремаксола и S-аденозил-L-метионина при экспериментальном поражении печени противотуберкулезными препаратами основного ряда в сочетании с алкоголем***

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения РФ, 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт экологической медицины Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Курского государственного медицинского университета» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 305041, Курск, ул. К. Маркса, 3

<sup>3</sup> Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 305041, Курск, ул. К. Маркса, 3

*Введение в течение 12 сут. противотуберкулезных препаратов: изониазид, рифампицин, пиразинамид в сочетании с алкоголем приводит к тяжелому токсическому поражению печени, сопровождающемуся характерной динамикой гистологических и биохимических маркеров в сочетании с развитием эндотелиальной дисфункции на фоне нормальных для данного вида животных значений артериального давления. Применение ремаксола и S-аденозил-L-метионина уменьшает гистологические признаки жировой дистрофии печени, приводя биохимические показатели в пределы физиологической нормы для данного вида животных. Гепатопротективное действие более выражено при применении ремаксола. Изучаемые препараты обладают выраженным эндотелиопротективным действием на выбранной модели патологии и приводят к снижению коэффициента эндотелиальной дисфункции и его приближению к уровню интактных животных.*

**Ключевые слова:** *противотуберкулезные препараты, ремаксол, S-аденозил-L-метионин, эндотелиопротективная активность, гепатопротективная активность*

D.S. Sukhanov<sup>1</sup>, E.B. Artyushkova<sup>2</sup>, V.T. Dudka<sup>3</sup>

## ***Comparative hepato- and endotelioprotective effect of remaxol and S-adenosyl-L-methionine in experimental defeat of a liver by antituberculosis essential drugs in a combination to alcohol***

<sup>1</sup> I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, 41, Kirochnayastr., Saint-Petersburg, 191015, Russia

<sup>2</sup> Ecological Medicine Institute of Kursk State Medical University, 3, Karl Marks str., Kursk, 305041, Russia

<sup>3</sup> Kursk State Medical University, 3, Karl Marks str., Kursk, 305041, Russia

*Introduction within 12 days of antituberculosis drugs: the isoniazid, rifampicin, pyrazinamide in a combination to alcohol leads to heavy toxic defeat of the liver, being accompanied characteristic dynamics of histologic and biochemical markers in a combination to development of endothelial dysfunction against normal for this type of animal values of arterial pressure. Application of remaxol and S-adenosyl-L-methionine reduces histologic symptoms of fatty dystrophy of a liver, bringing biochemical indicators into limits of physiological norm for this species of animals. Hepatoprotective activity is more expressed at application of remaxol. Studied medicines possess the expressed endotelioprotective activity on the chosen model of pathology and lead to decrease in factor of endothelial dysfunction and its approach to level of intact animals.*

**Key words:** *antituberculosis drugs, remaxol, S-adenosyl-L-methionine, endotelioprotective activity, hepatoprotective activity*



Патология печени, являющейся центральным органом химического гомеостаза, у больных туберкулезом характеризуется разнообразием этиологических и патогенетических факторов, среди которых выделяют специфические и неспецифические изменения. Первое место в ряду неспецифических изменений занимают лекарственные поражения печени [2—4]. Установлено, что практически все противотуберкулезные препараты (ПТП) оказывают гепатотоксическое действие различной степени выраженности [7, 13]. В то же время, злоупотребление алкоголем, выявленное более чем у 50% больных туберкулезом, усугубляет проявления лекарственной гепатотоксичности [5]. В комплексном лечении лекарственных поражений печени целесообразно использование метаболической и коферментной терапии, положительно влияющей на повышение устойчивости гепатоцитов к токсическому воздействию и оказывающей детоксикационный эффект с восстановлением функции пораженного органа [6].

В клинической практике положительно зарекомендовали себя препараты антигипоксического действия на основе янтарной кислоты. Одним из сукцинатсодержащих препаратов является реамберин (раствор Na,N-метилглюкаминасукцината), позиционируемый как дезинтоксикационное средство антигипоксического действия при ряде патологических состояний [9]. Созданный на его основе оригинальный гепатопротекторный препарат ремаксол, содержащий янтарную кислоту (в виде N-метилглюкаминовой соли), метионин, рибоксин и никотинамид в комплексе с электролитами, доказал свою эффективность в ряде доклинических и клинических исследований [8, 11].

*Цель работы* — оценка эффективности использования гепатопротекторов с выраженным эндотелиопротективным действием при моделировании токсического поражения печени комбинацией противотуберкулезных препаратов и алкоголя.

### Методика

Исследование проведено на базе лаборатории доклинических исследований НИИ ЭМ КГМУ в соответствии с утвержденными правилами лабораторной практики. Исследование выполнено на 40 белых крысах-самцах массой 180—200 г.

Токсическое поражение печени (ПТП) моделировали применением изониазида, рифампицина, пиразинамида и этилового спирта с учетом дозировок, используемых в СПб НИИ фтизиопульмонологии [10, 12]. Изониазид вводили подкожно 50 мг/кг; рифампицин и пиразинамид — внутривенно (250 и 45 мг/кг соответственно). Алкоголь (10%-ный раствор алкоголя с добавлением в качестве вкусовой добавки 0,1% сахара) находился в поилке в свободном до-

ступе. Исследуемые препараты вводили в дозах: ремаксол — 25 мл/кг, адemetионин (лиофилизат) — 0,9 мл/кг. Препараты вводили в течение 12 сут., оценку показателей производили на 13-е сутки эксперимента.

Все животные методом рандомизации были разделены на следующие группы (n=10 в каждой группе):

- интактные;
- контроль (ПТП + алкоголь);
- ПТП + алкоголь + ремаксол;
- ПТП + алкоголь + S-аденозил-L-метионин (SAM, адemetионин).

Определяли уровень общего билирубина, общего белка, холестерина, триглицеридов, активности АСТ, АЛТ и щелочной фосфатазы на биохимическом анализаторе Виталон 400. Оценка эффективности препаратов подтверждалась гистологическим исследованием печени. Материал фиксировали в 10% формалине. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Показатели гемодинамики — систолическое артериальное давление (САД), диастолическое артериальное давление (ДАД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) измеряли непрерывно посредством аппаратно-программного комплекса «Віорас». Проводили функциональные сосудистые пробы: эндотелий-зависимую вазодилатацию (ЭЗВД) — внутривенное введение ацетилхолина (АХ) в дозе 40 мг/кг из расчета 0,1 мл на 100 г массы тела животного, а также эндотелий-независимую вазодилатацию (ЭНВД) в ответ на внутривенное введение раствора нитропрусида натрия (НП) в дозе 30 мг/кг из расчета 0,1 мл на 100 г массы тела животного.

Коэффициент эндотелиальной дисфункции (КЭД) рассчитывали [1] как отношение площади треугольника над кривой восстановления АД в ответ на введение НП (SHП) к площади треугольника над кривой восстановления АД в ответ на введение АХ (SAX):

$$КЭД = \frac{S_{НП}}{S_{АХ}}$$

Результаты обрабатывали статистически. Оценка статистической значимости различий при межгрупповых сравнениях производилась по двустороннему t-критерию Стьюдента для независимых групп. Различия считались статистически значимыми при значениях  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Статистически значимых различий показателей массы тела, сердца и печени между интактными, контрольными и экспериментальными группами крыс на 13-е сутки эксперимента выявлено не было.

Биохимические показатели в экспериментальных группах  
через 12 сут. после моделирования поражения печени и его коррекции

Препарат	Триглице- риды	АсАТ, Ед./л	АлАТ, Ед./л	Щелочная фосфатаза, Ед./л	Билирубин, мкмоль/л	Общий белок, г/л	Холестерин, ммоль/л
Интактные (n=10)	0,30±0,05	162,8±11,1	69,2±8,4	152,9±16,3	1,7±0,4	58,0±1,5	0,86±0,08
Контроль (ПТП + алкоголь) (n=10)	0,77±0,13*	218,5±11,2*	72,7±9,6	365,6±72,7*	19,3±7,4*	60,6±1,8	1,75±0,25*
ПТП + алкоголь + ремаксол (n=10)	0,29±0,08**	137,5±5**	66,9±3,8	112,8±10,5**	2,7±1,1**	61,2±2,0	0,73±0,03**
ПТП + алкоголь + SAM (n=10)	0,33±0,05**	137,8±6,6**	69,0±12,4	148,5±21,3**	4,21±1,93**	58,5±1,7	0,71±0,05**

Примечание. \* —  $p < 0,05$  в сравнении с интактными животными; \*\* —  $p < 0,05$  в сравнении с ПТП + алкоголь 12 сут.

При оценке биохимических показателей через 12 сут. после моделирования поражения печени обнаружено статистически значимое увеличение концентрации триглицеридов, АСТ, щелочной фосфатазы, общего билирубина и холестерина что свидетельствует о вовлечении печени в патологический процесс (таблица).

Введение ремаксолола и адеметионина на фоне комбинации противотуберкулезных препаратов и алкоголя выявило статистически значимое снижение показателей, характеризующих поражение паренхимы печени, и их максимальное приближение к таковым у интактных животных (таблица).

При гистологическом исследовании через 12 сут. после ПТП выявлена диффузная крупнокапельная и мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов, с тотальным поражением долек (рис. 1).

Отмечается нарушение структуры балок, на обширных участках коллабированы синусоидные капилляры. Очагово наблюдается кариолизис в гепатоцитах. Изменения были однотипны во всех зонах печеночных долек.

У животных, получавших ремаксол, участки с очаговой крупнокапельной и мелкокапельной жировой

дистрофией гепатоцитов, чередовались с участками печеночной ткани с полным отсутствием патологических изменений (рис. 2).

Гистологическая картина у животных, получавших раствор адеметионина, схожа с таковой в группе животных, получавших ремаксол.

Моделирование поражения печени в течение 12 сут., а также введение растворов ремаксолола и адеметионина не приводило к статистически значимому изменению исходного артериального давления во всех сериях экспериментов.

При внутривенном введении экспериментальным животным раствора ацетилхолина наблюдалось падение уровня артериального давления с последующим его восстановлением. Моделирование поражения печени и введение исследуемых препаратов статистически значимо не влияло на уровень снижения артериального давления во всех экспериментальных группах. Статистически значимых различий между действием изучаемых препаратов также не наблюдалось. Время восстановления артериального давления при введении ремаксолола и SAM составило  $44,2 \pm 2,2$  и  $43,1 \pm 1,9$  с соответственно ( $p < 0,05$  в обоих случаях по сравнению с группой контроля).

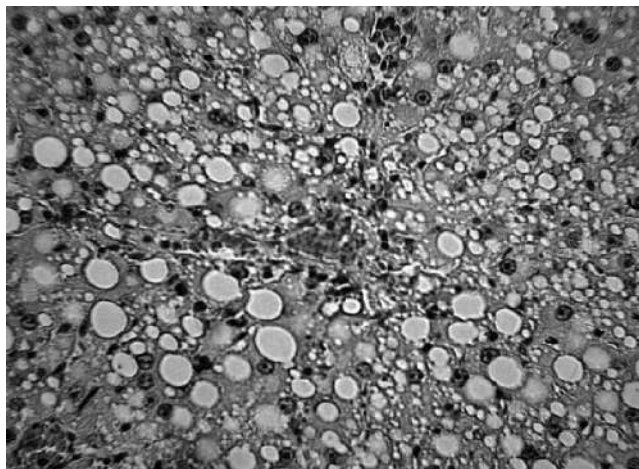


Рис. 1. Печень крысы контрольной группы на 13-е сут. эксперимента. Выраженная крупнокапельная и мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 280$ .

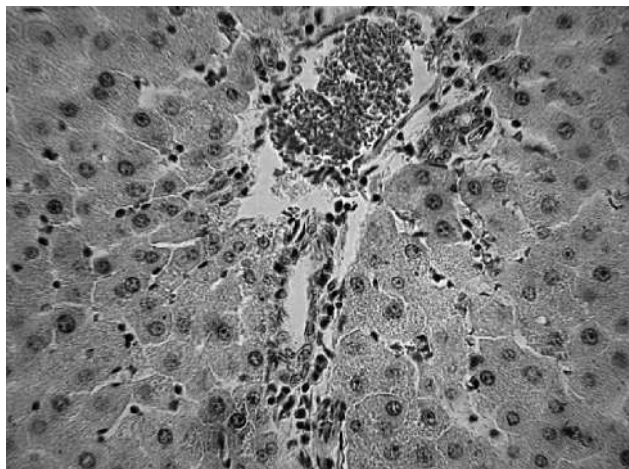


Рис. 2. Ремаксол в/б. Участок с нормальным гистологическим строением печеночных долек. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 280$ .

У животных, получавших в течение 12 сут. противотуберкулезные препараты и алкоголь, время реакции эндотелийзависимой вазодилатации сокращалось на 22,8% (с  $46,5 \pm 3,6$  до  $35,9 \pm 3,1$  с,  $p < 0,05$ ).

Введение растворов ремаксола и адеметионина в течение 12 сут. на фоне моделирования поражения печени ПТП статистически значимо пролонгировало реакцию эндотелийзависимой вазодилатации, приближая ее значения к таковым в группе интактных животных. В ответ на введение раствора нитропрусида натрия также наблюдалось падение значений систолического и диастолического артериального давления с последующей постепенной нормализацией показателей. При этом ПТП в сочетании с алкоголем и исследуемыми препаратами не влияло на выраженность реакции эндотелийнезависимой вазодилатации по систолическому АД и диастолическому АД.

Было установлено, что у крыс, получавших противотуберкулезные препараты и алкоголь в течение 12 сут., продолжительность реакции эндотелийнезависимой вазодилатации увеличивалась на 25,8% (с  $49,6 \pm 2,5$  до  $61,9 \pm 5,5$  с,  $p < 0,05$ ). Исследуемые препараты статистически значимо уменьшали время эндотелийнезависимой вазодилатации.

При расчете коэффициента эндотелиальной дисфункции, было установлено, что под влиянием введения противотуберкулезных препаратов и алкоголя через 12 сут. КЭД увеличивался в 1,8 раза, составив  $2,2 \pm 0,19$ . Статистически значимым положительным воздействием на величину коэффициента эндотелиальной дисфункции обладали оба исследуемых препарата (при введении ремаксола величина КЭД составила  $1,3 \pm 0,12$ ), что свидетельствует об эффективной коррекции моделируемого поражения печени и важной роли в данной патологии сосудистого эндотелия.

Таким образом, токсическое поражение печени сопровождается характерной динамикой гистологических и биохимических маркеров в сочетании с выраженной эндотелиальной дисфункцией.

Используемые препараты обладают гепатопротективными эндотелиопротективным действием, причем данная характеристика у ремаксола более выражена, чем у адеметионина.

Растворы ремаксол и адеметионин обладают выраженным эндотелиопротективным действием на выбранной модели патологии, характеризующимся уменьшени-

ем коэффициента эндотелиальной дисфункции через 12 сут. после моделирования поражения печени.

### Список литературы

1. *Артюшкова Е.Б., Покровский М.В., Покровская Т.Г.* Эндотелио- и кардиопротективные эффекты препарата фосфоглив при экспериментальном моделировании дефицита оксида азота // Рос. мед.-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. — 2008. — №4. — С. 42—47.
2. *Борзакова С.Н., Аксенова Б.А., Рейзис А.Р.* Лекарственные поражения печени у детей, больных туберкулезом // Туберкулез и бол. лёгких. — 2010. — №8. — С. 3—12.
3. *Вольф С.Б., Суханов Д.С., Романцов М.Г.* Медикаментозные поражения печени при полихимиотерапии туберкулеза // Вестник СПбГМА им. И.И. Мечникова. — 2009. — №1. — С. 172—176.
4. *Гурьева М.Э.* Туберкулез и заболевания печени. Фтизиатрия (национальное руководство). — М.: Гэотар-Медиа, 2007.
5. *Загдын З.М., Браженко Н.А., Браженко О.Н.* и др. Коморбидность туберкулеза, алкоголизма и наркомании // Пульмонология. — 2007. — Вып. 2. — С. 22—27.
6. *Зборовский А.Б., Тюренков И.Н., Белоусов Ю.Б.* Неблагоприятные побочные эффекты лекарственных средств. — М.: МИА, 2008.
7. Клиническая фармакология: Национальное руководство / Под ред. Ю.Б. Белоусова, В.Г. Кукеса, В.К. Лепахина, В.И. Петрова. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009.
8. *Коваленко А.Л., Суханов Д.С., Романцов М.Г.* Эффективность оригинального препарата «Ремаксол, раствор для инфузий» при поражениях печени различного генеза // Фарм. промышл. — 2010. — №4. — С. 58—61.
9. Реамберин (пострегистрационные клинические исследования 1999—2005) // Рефераты опубликованных в печати научных статей. — СПб., 2005.
10. *Сливка Ю.И.* Сравнительная характеристика гепатотоксичности изониазида, рифампицина и пиразинамида // Фармакология и токсикология. 1989. — Т. 52, №4. — С. 82—85.
11. *Суханов Д.С., Коваленко А.Л., Романцов М.Г., Петров А.Ю., Саватеева Т.Н.* Цитопротекторная активность сукцинатсодержащих препаратов на функциональную активность печени в эксперименте // Экспер. Клин. фармакол. — 2010. — Т. 73, №8. — С. 35—39.
12. *Суханов Д.С., Виноградова Т.И., Заболотных Н.В.* и др. Сравнительное изучение гепатопротективного действия ремаксола, реамберина и адеметионина при повреждении печени противотуберкулезными препаратами (экспериментальное исследование) // Антибиотики и химиотерапия. — 2001. — Т. 56, №1—2. — С. 12—16.
13. *Senaratne W.V., Piniyapathirage M.J., Perera G.A.* et al. Anti-tuberculosis drug Induced Hepatitis — a Sri Lankan experience // Ceylon Med. J. — 2006. — Vol. 51, №2. — P. 9—14.

Поступила 10.09.12

### Сведения об авторах:

*Артюшкова Елена Борисовна*, д-р биол. наук, дир. НИИ ЭМ ГБОУ ВПО КГМУ Минздрава РФ  
*Дудка Виктор Тарасович*, зав. каф. патологической анатомии ГБОУ ВПО

Н.В. Соловьева<sup>1</sup>, Н.А. Шидакова<sup>2</sup>, А.Г. Соловьев<sup>1</sup>, И.А. Кирпич<sup>1</sup>

## **Изменения жирнокислотного состава сыворотки крови у больных с острым алкогольным психозом**

<sup>1</sup> Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 63061, Архангельск, пр. Троицкий, 51

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Северный медицинский клинический центр им. Н.А. Семашко Федерального медико-биологического агентства России», 163061, Архангельск, пр. Троицкий, 115

*Состояние острого алкогольного психоза (ОАП) у больных синдромом зависимости от алкоголя (СЗА) характеризуется резким снижением общего содержания свободных высших жирных кислот (ВЖК), обусловленным в большей степени уменьшением ненасыщенных ВЖК. Особенности состава свободных ВЖК обосновывают выделение синдрома жирнокислотного дисбаланса у наркологических больных в состоянии ОАП.*

**Ключевые слова:** острый алкогольный психоз, высшие жирные кислоты, синдром жирнокислотного дисбаланса

N.V. Solovieva<sup>1</sup>, N.A. Shidakova<sup>2</sup>, A.G. Soloviev<sup>1</sup>, I.A. Kirpich<sup>1</sup>

## **Changes fatty acid composition of blood serum of patients with acute alcoholic psychosis**

<sup>1</sup> Northern State Medical University (NSMU), 51, Troitsky ave., Arkhangelsk, 163061, Russia

<sup>2</sup> N.A. Semashko Northern Medical Clinical Centre FMBA, 15, Troitsky ave., Arkhangelsk, 163061, Russia

*The state of acute alcoholic psychosis (AAP) in patients with alcohol dependence syndrome (ADS) is characterized by a sharp decrease in the total content of free higher fatty acids (HFA), due to the greater decrease in unsaturated HFA. Features of HFA justify the selection of free fatty acid imbalance syndrome in addicted patients in a state of the AAP.*

**Key words:** acute alcoholic psychosis, higher fatty acids, fatty acid imbalance syndrome

Развитие острого алкогольного психоза (ОАП) у больных синдромом зависимости от алкоголя (СЗА) сопровождается отклонениями биохимического гомеостаза, заключающимися в повышении активности ферментов сыворотки крови [5]. Общепатологические эффекты этанола имеют своим следствием нарушение липидного обмена. Длительный прием алкоголя приводит к поражению эпителия кишечника, нарушению всасывания и является ведущим фактором в развитии недостаточности незаменимых жирных кислот при СЗА [3].

Несмотря на большое количество работ, посвященных проблеме нарушений липидного обмена у больных с СЗА, вопросы изменения состава высших жирных кислот (ВЖК) сыворотки крови в динамике ОАП освещены в литературе недостаточно, что и определило актуальность данного исследования.

*Цель исследования* — установить значимость показателей липидного обмена и свободных ВЖК в патогенезе ОАП.

**Для корреспонденции:** Соловьева Наталья Владиславовна, канд. мед. наук, доцент, зав. каф. патологической физиологии ГБОУ ВПО «СГМУ» Минздрава РФ. E-mail: taurus221@yandex.ru

### **Методика**

Обследовано 92 мужчины (ср. возраст  $42,3 \pm 1,1$  года), из них — 66 чел. СЗА в состоянии ОАП, жителей г. Архангельска и Архангельской области. Обследование больных осуществлялось в 1 сут. госпитализации в наркологическое отделение на высоте ОАП и на 6—7 сут. — к среднему времени завершения проведения курса интенсивной терапии. Контрольную группу составили 26 практически здоровых мужчин (ср. возраст  $41,9 \pm 1,5$  года), у которых были исключены СЗА и употребление спиртных напитков в течение последних 2 недель, а также заболевания желудочно-кишечного тракта в стадии обострения. Обследование контрольной группы осуществлялось однократно.

Определение показателей липидного обмена — общего холестерина (ОХ), триглицеридов (ТГ), содержание липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) проводилось стандартизованными методиками на автоматическом анализаторе «Cobas Mira-S» (Австрия) наборами «Cotmax» (Польша); содержание липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) определялись расчетным методом по формуле:  $ЛПНП = ХС - ТГ/2,2$ . — ЛПВП.

Таблица 1

Показатели липидного обмена у больных ОАП в динамике лечения, ммоль/л (M±SD)

Показатели	Контрольная группа	Больные ОАП	
		1-е сут.	6—7-е сут.
ХС	5,13±0,74	4,94±1,28	4,59±0,99
ТГ	1,43±0,61	0,81±0,38**	1,24±0,40##
ЛПВП	1,25±0,31	1,81±0,52**	1,22±0,35#
ЛПНП	3,37±0,65	1,59±0,63**	2,94±0,71

Примечание. Отличия достоверны: по отношению к контрольной группе \* —  $p < 0,01$ ; \*\* —  $p < 0,001$ ; по отношению к 1-м суткам при # —  $p < 0,01$ ; ## —  $p < 0,001$

Таблица 2

Содержание насыщенных ВЖК в сыворотке крови больных в динамике ОАП, мг/мл (M±SD)

ВЖК	Контрольная группа	Больные в состоянии ОАП	
		1 сут.	6—7 сут.
Пальмитиновая (C <sub>16:0</sub> )	0,7330±0,0825	0,3650±0,052*	0,2510±0,015*
Стеариновая (C <sub>18:0</sub> )	0,2620±0,028	0,1130±0,017*	0,0790±0,009*
Арахидовая (C <sub>20:0</sub> )	0,0038±0,0005	0,0095±0,0013*	0,0090±0,001*
Бегеновая (C <sub>22:0</sub> )	0,0210±0,008	0,0013±0,0003*	0,0012±0,0003*
Суммарное содержание насыщенных ВЖК	1,012	0,496	0,339

Примечание. Отличия достоверны: по отношению к контрольной группе \* —  $p < 0,001$

Определение состава ВЖК в сыворотке крови осуществлялось методом газожидкостной хроматографии на газовом хроматографе «ГАЛС-311» фирмы «Люмекс» с пламенно-ионизационным детектором. Идентификацию жирных кислот — пальмитоолеиновой (C<sub>16:1</sub>), пальмитиновой (C<sub>16:0</sub>), линоленовой (C<sub>18:3</sub>), линолевой (C<sub>18:2</sub>), олеиновой (C<sub>18:1</sub>), стеариновой (C<sub>18:0</sub>), эйкозеновой (C<sub>20:1</sub>), арахидовой (C<sub>20:0</sub>), эруковой (C<sub>22:1</sub>) и бегеновой (C<sub>22:0</sub>) проводили с использованием стандартных смесей метиловых эфиров жирных кислот фирмы «Sigma».

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета электронных таблиц Excel.

### Результаты и обсуждение

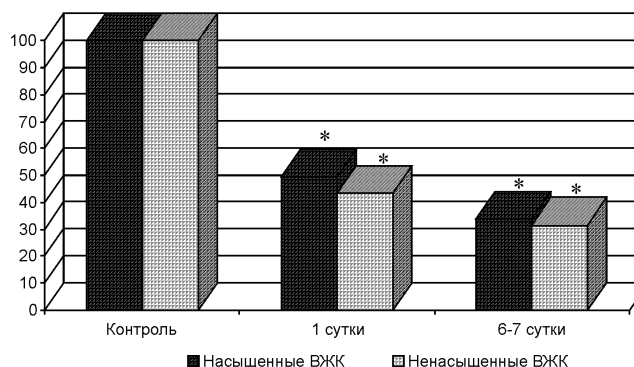
На высоте ОАП содержание ХС не превышало показатели здоровых лиц; однако имело место снижение содержания ТГ — в 1,6 раза ( $p < 0,001$ ) и ЛПНП — в 1,5 ( $p < 0,001$ ), при этом наблюдалось повышение ЛПВП — в 1,4 раза ( $p < 0,001$ ) (табл. 1).

Имеются сведения, что у лиц с СЗА повышение содержание ЛПВП является ответом гепатоцитов на воздействие алкоголя, в результате которого усиливается этерификация жирных кислот [6]. Однако механизм этого явления неоднозначен: ряд авторов считает, что алкоголь усиливает захват холестерина ЛПВП с мембран периферических клеток и последующий транспорт его с ЛПВП на содержащие апо-В-липопротеиды [4]. Полагают, что алкоголь подавляет сигнализацию апо Е, тем самым препятствуя взаимодействию его с ЛПВП

и, соответственно, переносу на данный белок холестерина; важную роль при этом играет снижение активности плазменных липидпереносящих белков [8].

На 6-е—7-е сут. детоксикационной терапии уровень ТГ повысился почти в 1,5 раза ( $p < 0,01$ ), а содержание ЛПВП уменьшилось в 1,4 раза ( $p < 0,01$ ) по сравнению с 1-ми сутками (табл. 1). В физиологических условиях ТГ в печени расходуются для обеспечения клетки энергией. При разрушении алкоголем мембран митохондрий паренхиматозные клетки утрачивают способность адекватно метаболизировать жиры, в связи с этим отмечается накопление ТГ [7].

Для более глубокого понимания нарушений липидного обмена у больных СЗА в динамике ОАП нами было



Содержание насыщенных и ненасыщенных ВЖК в сыворотке крови в динамике ОАП (% по отношению к контрольной группе): отличия достоверны по отношению к контрольной группе при \* —  $p < 0,001$

исследовано содержание насыщенных и ненасыщенных ВЖК: в 1-е сут. наблюдения оно составило 49,6% ( $p < 0,001$ ) и 43,4% ( $p < 0,001$ ), на 6—7 сут. — 33,9% ( $p < 0,001$ ) и 31,6% ( $p < 0,001$ ) соответственно по отношению к контрольной группе (рисунок).

Наибольшее снижение содержания насыщенных свободных ВЖК происходило за счет пальмитиновой — на 49,3% ( $p < 0,001$ ) и стеариновой кислот — на 43,2% ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контролем. На этом фоне имело место увеличение содержания арахидоновой кислоты на 39,9% ( $p < 0,001$ ), являющейся производной арахидоновой кислоты, что может косвенно свидетельствовать о высоком содержании последней, являющейся субстратом для синтеза медиаторов воспаления.

К 6-м — 7-м сут. наблюдения содержание насыщенных свободных ВЖК продолжило снижение и составило для пальмитиновой — 65,8% ( $p < 0,001$ ), а стеариновой кислоты — 69,9% ( $p < 0,001$ ). Это может свидетельствовать о снижении энергоемких и пластических субстратов вследствие значительных метаболических перестроек в организме при ОАП (табл. 2).

В 1-е сут. наблюдения нами отмечено 1,5—2-кратное снижение содержания ненасыщенных ВЖК по сравнению с контрольными значениями, за исключением эйкозеновой и эруковой кислот. В процессе купирования ОАП содержание ВЖК имело разнонаправленную динамику: содержание линоленовой кислоты составило 125% ( $p < 0,001$ ), а линолевой, пальмитолеиновой, олеиновой, эйкозеновой и эруковой кислот имело тенденцию к дальнейшему, статистически значимому, снижению и составило 28,9% ( $p < 0,001$ ), 46,2% ( $p < 0,001$ ), 37,5% ( $p < 0,001$ ), 68% ( $p < 0,05$ ) и 86,5% соответственно. Такие особенности количественного состава ВЖК могут служить основой для разбалансированного синтеза их производных — эйкозаноидов — и запуска дисметаболических реакций организма.

Таким образом, у наркологических больных в большей степени уменьшалось содержание ненасыщенных ВЖК, чем насыщенных. Нами зарегистрирован более выраженный дефицит полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) (линолевой и линоленовой), нежели мононенасыщенных (пальмитолеиновой, олеиновой и эйкозеновой). Снижение содержания ПНЖК может быть результатом перекисного окисления липидов (ПОЛ), расходования с энергетиче-

ской и пластической целями или снижения продукции эндогенных ПНЖК [2]. Можно предположить, что снижение количества ПНЖК является адаптивной реакцией, призванной уменьшить их доставку в ткани. В свою очередь, дефицит ПНЖК в тканях способен снизить предрасположенность к ПОЛ [1].

Таким образом, совокупность представленных в работе данных позволяет выделить у больных СЗА в состоянии ОАП синдром жирнокислотного дисбаланса, проявляющийся низким содержанием липидных фракций в спектре ВЖК. К окончанию периода детоксикационной терапии полного восстановления липидных фракций не происходит, что следует учитывать в процессе лечебно-реабилитационных мероприятий у больных ОАП.

### Список литературы

1. *Исаев В.А.* Эйконол и атеросклероз. — М.: ЗАО «Мир и согласие», 2008. — 350 с.
2. *Коси́нец В.А., Осочук С.С., Яроцкая Н.Н.* Влияние препарата «Омегавен» на состояние мембран митохондрий печени при экспериментальном распространенном гнойном перитоните. — ГОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» // Новости хирургии. — 2012. — №1. — С. 10—15.
3. *Мехтеев С.Н., Гриневич В.Б., Кравчук Ю.А., Карпов С.В., Широких А.В.* Современный взгляд на проблему диагностики и лечения алкогольного стеатогепатита // Consilium Medicum. — 2008. — №2. — С. 36—41.
4. *Панина В.Л., Зыков В.А., Тузиков М.Ф.* Изменения липопротеинового спектра сыворотки крови у больных хроническим алкоголизмом // Бюлл. Сиб. отделения РАМН. — 2010. — №2. — С. 70—74.
5. *Соловьева Н.В., Шидакова Н.А., Лейхтер С.Н., Лебедева О.В., Бажукова Т.А., Кирпич И.А., Соловьев А.Г., Сидоров П.И.* Изменения ферментативной активности крови и микробиоценоза толстого кишечника у больных с острыми психозами и их пробиотическая коррекция // Наркология. — 2007. — №12. — С. 57—61.
6. *Титов В.Н., Лисицын Д.М.* Регуляция перекисного окисления *in vivo* как этапа воспаления. Олеиновая кислота, захватчики активных форм кислорода и антиоксиданты // Клиническая лабораторная диагностика. — 2005. — №6. — С. 3—12.
7. *Peng F.C., Tang S.H., Huang M.C., Chen C.C., Kuo T.L., Yin S.J.* Oxidative status in patients with alcohol dependence: a clinical study in Taiwan // J. Toxicol. Environ. Health A. — 2005. — №68 (17—18). — P. 1497—1509.
8. *Thatcher D.L., Clark D.B.* Cardiovascular risk factors in adolescents with alcohol use disorders // Int. J. Adolesc. Med. Health. — 2006. — Jan. — Mar. — 18(1). — P. 151—157.

Поступила 01.11.12

### Сведения об авторах:

*Шидакова Наталья Александровна*, канд. мед. наук, врач-лаборант, ФГБУЗ «СМКЦ им. Н.А. Семашко ФМБА России»

*Соловьев Андрей Горгоньевич*, проф. кафедры психиатрии и клинической психологии ГБОУ ВПО «СГМУ» Минздрава РФ

*Кирпич Ирина Андреевна*, д-р биол. наук, проф. кафедры биомедицинской химии ГБОУ ВПО «СГМУ» Минздрава РФ

## **Правила оформления статей для публикации в журнале «Патологическая физиология и экспериментальная терапия»**

1. Статьи, оформленные без соблюдения указанных правил, к рассмотрению не принимаются.
2. Все присланные работы обязательно проходят этап научного рецензирования, редакция оставляет за собой право сокращения публикуемых материалов и адаптации их к рубрикам журнала.
3. В редакцию направляются 2 экземпляра рукописи, которые сопровождаются направлятельным письмом учреждения, заверенным ответственным лицом, на имя главного редактора журнала. К рукописи прилагается электронный носитель (диск — CD), содержание которого должно быть идентичным принтерной распечатке.
4. Текст печатается в тестовом редакторе Word шрифтом Times, 14 кеглем, через 1,5 интервала на листе А4. Поля верхнее и нижнее — 2,5 см, поле слева — 3,5 см, поля справа — 1,5. Запрещается использование автоматических переносов. Внизу справа проставляется нумерация страниц.
5. Объем оригинальных статей не должен превышать 8 страниц; обзоров — 15; кратких сообщений — 3 страницы. Исключение — заказные обобщающие статьи, объем которых оговаривается редколлегией 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».**