

**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 публикации значимых результатов  
диссертаций на соискание ученой  
степени доктора 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: Издательство «Гениус Медиа»  
E-mail: genius-media@mail.ru

ISSN 0031-2991  
Патологическая физиология и  
экспериментальная терапия.  
2013. №1. 1—120.

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

Тираж 300 экз.

© ООО Издательство «Гениус Медиа», 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.*

**№1, 2013**  
**ЯНВАРЬ—МАРТ**

## **РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ**

**Главный редактор Б.Б. Мороз**

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

## **Редакционный совет**

**Ю.В. Балякин (Москва), Ю.Ю. Бяловский (Рязань),  
В.Т. Долгих (Омск), А.М. Дыгай (Томск),  
А.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

- Гусев Е.Ю., Черешнев В.А.**  
Системное воспаление: теоретические и методологические подходы к описанию модели общепатологического процесса. Часть 2. Эволюционные аспекты . . . . . 3
- Родина А.В., Северин С.Е.**  
Роль адипонектина в патогенезе метаболического синдрома и подходы к терапии . . . . . 15

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Колобов В.В., Фомина В.Г., Горбатов В.Ю., Давыдова Т.В.**  
Сравнение эффектов антител к глутамату на нейрональную активность каспазы-3 и нарушения памяти у крыс, вызванные введением  $\alpha\beta_{25-35}$  в ядра Мейнерта . . . . . 27
- Мензиков С.А., Карпова М.Н., Калинина М.В.**  
Прямое вовлечение глюкозы и  $Mg^{2+}$ -АТФ в регуляцию  $GABA_A$ -сопряженной  $Cl^-/HCO_3^-$ -АТФазы плазматических мембран мозга крыс в экспериментах *in vitro* . . . . . 33
- Ребров И.Г., Калинина М.В.**  
Влияние нарушения целостности синаптических мембран мозга крыс на функциональную активность  $GABA_A$ -рецептор/ $Cl^-$ ионофорного комплекса в ЦНС . . . . . 37
- Куликов В.П., Кузнецова Д.В.**  
Реакция мозгового кровотока и системного артериального давления на гиперкапнию и гипоканию у людей . . . . . 41
- Кузнецова Л.А., Плеснева С.А., Шарова Т.С., Перцева М.Н.**  
Исследование гормонореактивности аденилатциклазной сигнальной системы в эритроцитах больных диабетом 2-го типа . . . . . 45
- Цибулевский А.Ю., Дубова Т.К., Максина А.Г., Соколинский Б.З., Пятницкий А.М., Медовый В.С., Анисимова В.Е.**  
Морфо-биофизическое исследование эритроцитов интактных и ваготомированных крыс в различные сроки после острой кровопотери . . . . . 50
- Панченков Д.Н., Баранов М.В., Астахов Д.А., Нечунаев А.А., Леонов С.Д., Бехтева М.Е.**  
Биохимические аспекты влияния антиортоостатической гипокинезии на течение экспериментального перитонита . . . . . 56
- Орлов А.А., Сабурин И.Н., Диланян М.Х., Скуратовская Л.Н., Репин В.С., Сербрикова Л.Е., Житков М.Ю., Евсеенков Э.Е.**  
Динамика формирования костной ткани у крыс под действием нового остеопластического материала «Norian» . . . . . 61
- Суханов Д.С., Виноградова Т.И., Демидик С.Н., Заболотных Н.В., Васильева С.Н., Коваленко А.Л., Витовская М.Л.**  
Иммунотропная и антигипоксантная терапия экспериментального лекарственно-чувствительного и лекарственно-устойчивого туберкулеза . . . . . 65
- Калинина О.В., Колотова Е.С., Панфилова Т.В., Штиль А.А., Фролов Б.А.**  
Природный тритерпеноид милацин предотвращает вызванный метотрексатом окислительный стресс и нормализует экспрессию генов *sur-2e1* и глутатионредуктазы в печени . . . . . 70
- Меркулов Ю.А., Пятков А.А., Меркулова Д.М.**  
Работа с ночными сменами как фактор дизрегуляции вегетативной нервной системы у машинистов локомотивов . . . . . 75

## МЕТОДИКА

- Макаренко А.Н., Морозов С.Г., Савосько С.И., Васильева И.Г.**  
Метод моделирования повторного локального геморрагического инсульта у крыс . . . . . 82

## ОБЗОРЫ

- Марков Х.М.**  
Мозговой кровоток и церебральный инсульт. Часть 1. Регуляция церебрального кровообращения . . . . . 86
- Кузник Б.И.**  
Свертываемость и фибринолитическая активность лимфы при различных патологических состояниях (обзор собственных данных и данных литературы) . . . . . 99
- Никифоров Н.Г., Грачев А.Н., Собенин И.А., Орехов А.Н., Кзышкowska Ю.Г.**  
Взаимодействие нативных и модифицированных липопротеидов низкой плотности с клетками интимы при атеросклерозе . . . . . 109

## ПАМЯТНЫЕ ДАТЫ

Выдающийся ученый и организатор здравоохранения. К 110-летию со дня рождения академика П.Д. Горизонтова (1902–1987) . . . . . 118

## CONTENTS

- Gusev E.Yu., Chereshev V.A.**  
Systemic inflammation: theoretical and methodological approaches to description of general pathological process model. Part 2. Evolution aspects
- Rodina A.V., Severin S.E.**  
The role of adiponectin in the pathogenesis of the metabolic syndrome and approach to therapy

## ORIGINAL ARTICLES

- Kolobov V.V., Fomina V.G., Gorbatov V.Yu., Davydova T.V.**  
Comparison of the effects of glutamate antibodies on neuronal activity of caspase 3 and memory impairment in rats induced by injection of  $A\beta_{25-35}$  into the Meynert nuclei
- Menzikov S.A., Karpova M.N., Kalinina M.V.**  
Direct involvement of the glucose and  $Mg^{2+}$ -ATP in the regulation of the  $GABA_A$ -coupled  $Cl^-/HCO_3^-$ -activated  $Mg^{2+}$ -ATPase of the plasma membrane from rat brain *in vitro* experiences
- Rebrov I.G., Kalinina M.V.**  
Effect of damage integrity rat brain synaptic membranes on the functional activity  $GABA_A$ -receptor/ $Cl^-$ ionophore complex in the CNC
- Kulikov V.P., Kuznetsova D.V.**  
The response of cerebral blood flow and systemic arterial blood pressure to hypercapnia and hypocapnia in humans
- Kuznetsova L.A., Plesneva S.A., Sharova T.C., Pertseva M.N.**  
Study of hormone responsiveness of the Adenyl cyclase signaling system in erythrocyte membranes of patients with type 2 Diabetes Mellitus
- Tsibulevsky A.Yu., Dubovaya T.K., Maksina A.G., Sokolinsky B.Z., Pyatnitsky A.M., Medovy V.S., Anisimova V.E.**  
Morpho-biophysical research of erythrocytes of intact and vagotomized rats in various terms after the acute hemorrhage
- Panchenkov D.N., Baranov M.V., Astakhov D.A., Nechunaev A.A., Leonov S.D., Behteva M.E.**  
Biochemical aspects of the influence of antiorostatic hypokinesia on the experimental peritonitis
- Orlov A.A., Saburina I.N., Dilanyan M.Kh., Skuratovskaya L.N., Repin V.S., Serebrikova L.E., Zhitkov M.Yu., Evseenkov E.E.**  
Dynamics of formation of bone tissue in rats under the influence of new xenotransplantat «Norian»
- Sukhanov D.S., Vinogradova T.I., Demidik S.N., Zabolotnyh N.V., Vasilieva S.N., Kovalenko A.L., Vitovskaya M.L.**  
Immunotropic and antihypoxant therapy of experimental drug-sensitive and drug-resistant tuberculosis
- Kalinina O.V., Kolotova E.S., Panfilova T.V., Shtil A.A., Frolov B.A.**  
The natural triterpenoid miltacin prevents methotrexate-induced oxidative stress and normalizes the expression of genes encoding the cytochrome P-450 2E1 isoform and glutathione reductase in the liver
- Merkulov Y.A., Pyatkov A.A., Merkulova D.M.**  
Work with night shift as a factor dysregulation of autonomic nervous system of locomotive drivers

## METHODS

- Makarenko A.N., Morozov S.G., Savosko S.I., Vasil'eva I.G.**  
Simulation of repeated local hemorrhagic stroke in rats

## REVIEWS

- Markov Kh.M.**  
Brain blood flow and cerebral insult. Part 2. Regulation of cerebral circulation
- Kuznik B.I.**  
Coagulation and fibrinolytic activity of lymph in various pathological conditions (review of own and literature data)
- Nikiforov N.G., Gratchev A.N., Sobenin I.A., Orekhov A.N., Kzyhskowska Yu.G.**  
Interaction of native and modified low density lipoprotein with intimal cells in atherosclerotic lesion

## ANNIVERSARY

Outstanding scientist and healthcare organizer (to the 110<sup>th</sup> anniversary of P.D. Gorizontov (1902–1987))

Е.Ю. Гусев, В.А. Черешнев

## **Системное воспаление: теоретические и методологические подходы к описанию модели общепатологического процесса. Часть 2. Эволюционные аспекты**

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. Chereshev

## **Systemic inflammation: theoretical and methodological approaches to description of general pathological process model. Part 2. Evolution aspects**

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

Всем живым существам присущи три базовые функции: питание, размножение и сохранение (защита от повреждения). Последняя функция потребовала уже у прокариот наличия специализированных структур генома. Так, у представителей всех биологических царств, кроме вирусов, выявлено 368 близких по функции и происхождению консервативных белков клеточного стресса [54]: белки теплового шока (БТШ), АТФазы, синтетазы и оксидоредуктазы, факторы регенерации ДНК, протеинкиназы, регуляторы клеточного цикла, апоптоза и протекторы клеточной регенерации. Клеточный стресс индуцируется факторами угрозы повреждения макромолекул [54], включая действующие через паттерн-распознающие рецепторы (ГПР) некоторые молекулы DAMP (danger-associated molecular patterns), к которым относят отдельные продукты тканевого повреждения и типовые микробные антигены — PAMP (pathogen-associated molecular patterns) [2]. Кроме того, универсальными индукторами клеточного стресса являются критические изменения показателей гомеостаза: рН, осмотического дав-

ления, температуры, оксигенации, электролитного и энергетического баланса, системы прооксидант—антиоксидант [2, 35], микроповреждения мембран, в том числе митохондриальных, ряда макромолекул, включая секретруемые белки, разрывы хромосомной ДНК и др. [2, 25, 33]. Эти изменения активируют ряд транскрипционных факторов (ТФ), прежде всего, NF-κB, являющихся своеобразным коллектором для многих путей клеточной активации [88]. Необходимо учитывать, что эти пути не линейны, они вовлечены в сетевые взаимодействия [16, 87, 109], в том числе за счет NF-κB [88]. Сетевые структуры интегрируют различные каналы активации ТФ, как и результаты этой активации на уровне генома, транскриптома, протеома и метаболома, а различные регуляторные системы имеют параллельные каналы активационных и супрессорных влияний. Поэтому последствие активационного воздействия на клетку не может являться абсолютно предсказуемым событием, по крайней мере, *in vivo*.

В условиях действия факторов повреждения характер информационного обмена, как между клетками, так и органами, меняется, появляются новые регуляторные системы, прежде всего цитокиновая сеть, включающая у человека более 100 цитокинов и их рецепторов [18].

**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

Способностью продуцировать и связывать тот или иной спектр цитокинов обладают, по-видимому, все активированные ядродержащие клетки млекопитающих, включая нейроны [100]. Цитокиновая сеть интегрирует активированные клетки в программы иммуногенеза и воспаления [117]. Отдельные составляющие цитокиновой сети при воспалении могут генерализоваться и при взаимодействии с нейроэндокринными факторами участвовать в развитии системной воспалительной реакции (СВР) [3, 124]. Формирование функциональных систем воспаления потребовало наличие сложных систем: регуляции, микроциркуляции, интеграции врождённого и адаптивного иммунитета. Все эти условия возникли у позвоночных, но их предвестники обнаруживаются и у беспозвоночных животных (БПЖ).

### Эволюция механизмов воспаления у беспозвоночных

Все современные типы животных (более 30) сформировались в кембрийский период — примерно 490—550 млн лет назад. За это время исчезали и появлялись новые виды. Однако сохранялся принципиальный уровень организации этих групп, а также основы предковых генов, обусловивших появление новых систем в различных ветвях эволюционного дерева [19].

Современные губки среди основных типов БПЖ наиболее близки к предковым докембрийским животным. В отличие от них высокоорганизованные БПЖ (ВО-БПЖ), имеющие специализированные органные системы, сформировали две основные ветви: первичноротые, их основные типы — кольчатые черви, нематоды, членистоногие, моллюски; и вторичноротые — иглокожие и хордовые (ланцетники и оболочники). В конце кембрия появились первые морские позвоночные (третий подтип хордовых). Система адаптивного иммунитета сформировалась позднее, у первых челюстных рыб — 430—450 млн лет назад [7]. Примерно в это же время появились и первые наземные ВО-БПЖ (членистоногие и черви).

Губки, несмотря на отсутствие чёткой органной дифференциации, имеют весьма развитую систему врожденного иммунитета, а именно: большой репертуар БТШ и других стрессорных молекул [91]; предковые формы белков гистосовместимости, обеспечивающие отторжение аллотрансплантата [76]; большой репертуар ПРР и других рецепторов контактного взаимодействия, включая толл-подобные рецепторы (TLR), различные лектины, интегрины, рецепторы суперсемейства иммуноглобулинов (с доменами С2 и V), в том числе интерлейкин (IL)-1-подобный рецептор [76, 126, 127]; дефенсины, другие катионные белки, опсонизирующие и антибиотикоподобные факторы [76, 105]. Относительно специализированными клетками врождённого иммунитета у губок являются подвижные амёбовидные фагоциты [76].

Рецепторный аппарат клеток губок ассоциирован с различными системами вторичных посредников, хорошо известными и у млекопитающих, включая митоген-активируемые протеинкиназы, аденилатциклазную и гуанилатциклазную системы, ГТФ-связывающие белки Ras (малые G-белки), систему протеинкиназы C, различные тирозинкиназы (включая Src-киназы), кальмодулин [53, 76, 127]. Губки имеют сложную систему семейств ТФ: Fox, Pax, Six, Sot, Fts, T-Vox и др. [57]. У ВО-БПЖ появились ключевые для развития клеточного стресса и продукции медиаторов воспаления семейства ТФ — NF-κB (отдельные формы есть и у губок), AP-1 и STAT [50, 89].

В отличие от губок, кишечнополостных и им подобных, ВО-БПЖ имеют сердечно-сосудистую (иглокожие, головоногие моллюски, членистоногие) или только сосудистую систему, у большинства видов незамкнутого типа, а у ланцетников, головоногих моллюсков (но есть прерывистость капилляров), большинства видов кольчатых червей и немертин — замкнутого [19]. Основу сосудов формирует базальная мембрана, как правило, не имеющая эндотелиальной выстилки. У головоногих моллюсков, кольчатых червей и оболочников на ламинарной поверхности мембраны могут фиксироваться уплощенные эндотелиоцит-подобные клетки и амёбоциты, не образующие сплошной эндотелиальной выстилки [19, 107]. Замкнутая система микроциркуляции ВО-БПЖ качественно отличается от системы микроциркуляции позвоночных и полностью не обеспечивает функцию тканевого питания и дыхания даже для их примитивных органов; воспалительная экссудативно-сосудистая реакция типичная для позвоночных у БПЖ практически невозможна.

Нервная система у ВО-БПЖ формируется нервными узелками, тяжами или трубками (у хордовых). Она связана с мышечной системой и органами чувств. Нейросекреторные клетки при стрессе выделяют в гемолимфу различные нейропептиды, включая опиаты, субстанцию P, а также АКТГ, катехоламины — преимущественно норадrenalин и дофамин, но разветвлённой симпатической нервной системы типичной для позвоночных у БПЖ нет [26, 40, 56]. Клетки APUD-системы и их скопления выделяют эндокринные факторы: различные полипептиды, включая инсулиноподобные пептиды, тироксин и некоторые стероидные гормоны [21, 40, 51]. Другие органы (дыхания, выделения, пищеварения, жировые тела и др.) примитивны и выявляются в полном комплекте не у всех видов ВО-БПЖ, включая хордовых.

Гемолимфа содержит гемоциты, в том числе фагоцитирующие гранулоциты [7, 38, 85]. Белковые факторы гемолимфы представлены медьсодержащими переносчиками кислорода, реже — гемоглобином (у отдельных видов моллюсков и иглокожих есть эритроци-

ты), антипротеиназами ( $\alpha_2$ -макроглобулин и др.) [103], опсоинами [12, 85, 89] — С-реактивным белком (СРБ), С-лектинами, включая маннозосвязывающие лектины (МВЛ), лизоцимом, катионными белками и другими бактерицидными факторами [7, 84, 89]. Гемоциты могут генерировать различные гидролазы и свободные радикалы (СР), имея для этого НАДФ-оксидазу, а у некоторых видов и NO-синтазу, а также ферментативные антиоксиданты: каталазу, глутатионпероксидазу, супероксиддисмутазу [5, 7, 45, 95, 111]. Активированные гемоциты могут продуцировать тромбоксаны (ТХ) и простагландины (РG, включая РGE<sub>2</sub>), но большинство видов ВО-БПЖ не производят лейкотриены (LT) [96].

Экспрессия ПРР у отдельных видов ВО-БПЖ достигает своего апогея и может во много раз превышать их разнообразие у человека. Например, у морских ежей (иглокожие) выявлено 222 гена TLR и 203 вида внутриклеточных рецепторов семейства NOD/NALP [42]. У ВО-БПЖ возникают и комплемент-подобные системы [79, 80, 89]. Так, у вторичноротых выявляются предковые факторы комплемента позвоночных: С3, рецепторы к продуктам его активации (СR), факторы альтернативного, а у асцидий (оболочники) дополнительно и лектинового путей активации. У различных групп ВО-БПЖ выявляются предковые формы ряда цитокинов: IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-16, IL-17, рецепторного ингибитора IL-1 (IL-1ra), фактора некроза опухоли (TNF), трансформирующего фактора роста бета (TGF $\beta$ ), фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (MIF), белки, гомологичные различным типам интерферонов (INF) [11, 49, 58, 62, 63, 89]. Некоторые из этих факторов имеют клеточные рецепторы и участвуют в палеоиммунных процессах. Однако их нельзя рассматривать как самостоятельную сетевую систему и напрямую ассоциировать с цитокинами высших позвоночных.

Функцию гемостаза могут выполнять гемоциты, которые при участии белковых факторов образуют агрегаты, одновременно выполняя свои антимикробные функции. С-лектины и другие опсоины могут формировать «рыхлые» тромбы. Эти процессы особенно хорошо изучены у многих видов членистоногих [61]. У ВО-БПЖ выявляются и предковые формы отдельных белковых факторов системы гемостаза, выполняющие различные функции — протеиназ, антипротеиназ, опсоинов и адгезинов [23, 61]. Так, отдельные домены фибриногена имеют древнее происхождение, а наиболее близкий по строению к фибриногену белок коагулоген/коагулин участвует в опсонизации грамотрицательных бактерий и агрегации гемоцитов. У хордовых обнаруживаются предковые формы ф. XIII, антитромбина III, общего предшественника ф. VIII и ф. Виллебранда. Однако большинство факторов системы гемостаза образовались у позвоночных в результате геной дупликации.

Как известно, БПЖ не имеют инвариабельных генов и системы адаптивного иммунитета, но уже у ВО-ПБЖ, в частности, у иглокожих, появляются RAG гены, близкие по структуре к генам рекомбиназ вирусов герпес-группы [24]. Предполагается, что эти структуры участвуют во врожденном противовирусном иммунитете.

У ВО-БПЖ отмечается формирование клеточных узелков, напоминающих гранулемы у высших позвоночных, за счёт плотных контактов между различными типами гемоцитов, инкапсулирующих паразитов и инородные тела [38]. Также практически все типы ВО-БПЖ способны к острофазному ответу и другим классическим проявлениям СВР, а именно: повышению в гемолимфе количества фагоцитов, С3, лизоцима, СРБ, лектинов, дефенсинов, некоторых эндокринных факторов [12, 62, 78, 84, 85, 89]. Острофазный ответ инициируется травмой, но сильнее — действием РAMP, при этом ВО-БПЖ могут сохранять жизнеспособность при действии летальных для млекопитающих концентраций липополисахарида грамотрицательных бактерий (LPS) [78].

Таким образом, БПЖ имеют в целом высокий уровень врожденного иммунитета при отсутствии адаптивного иммунитета и несопоставимо более низкую организационную организацию в сравнении с позвоночными. Одновременно ВО-БПЖ имеют предковые органно-тканевые и генетические структуры для появления сложных систем позвоночных. Исходным условием для этого, как мы полагаем, стала качественно иная система микроциркуляции крови, возникшая одновременно с появлением первых позвоночных. В частности, роль микроциркуляции в формировании органно-тканевых систем очевидна при сопоставлении строения жабр рыб с примитивными жабрами и жаберными щелями ВО-БПЖ [29].

### Эволюция механизмов воспаления у позвоночных

*Микроциркуляция.* Наиболее близок к первым бесчелюстным позвоночным сохранившийся до наших времён таксон круглоротых рыб, объединяющих примерно 40 видов миног и миксин. У этих животных есть большинство органов, присущих позвоночным (включая передние отделы головного мозга), кроме иммунной системы [14]. Современные круглоротые имеют все отделы микроциркуляторной сети, включая сократимые прекапилляры, капилляры, посткапилляры, систему сфинктеров и анастомозов микрососудов, непрерывную и дифференцированную эндотелиальную выстилку, а также разветвленную симпатическую нервную систему, тканевые аналоги мозгового вещества надпочечников высших позвоночных, ренин-ангиотензиновую систему, NO-регуляцию, эндотелин I, большое число других паракрынных регуляторов сосудистого тонуса [14, 97]. Сократитель-

ные микрососуды круглоротых, также как и у других позвоночных, реагируют на гипоксию и иные изменения гомеостаза [97]. Эволюция микроциркуляции шла по направлению формирования тканеспецифичных типов микрососудов, дальнейшей дифференциации эндотелиоцитов, увеличения плотности микроциркуляторной сети [6, 73]. Также отмечается усиление экссудативно-сосудистых реакций, требующих и развития системы лимфотока:

1) *круглоротые* имеют примитивные лимфатические сердца;

2) *челюстные* рыбы дополнительно имеют развитую систему лимфатических щелей и полостей;

3) у *земноводных* дополнительно появляются лимфатические сосуды;

4) *рептилии* имеют сосудистую сеть с фрагментарным гладкомышечным и клапанным компонентом;

5) *птицы* — полностью сформированную сосудистую сеть с наличием у многих, но не у всех видов, лимфатических узлов;

6) *млекопитающие* — более развитую сеть лимфатических сосудов и более совершенные лимфатические узлы [6, 14, 31, 52, 71, 108].

Можно выделить два этапа синхронного усложнения общей организации и сосудистой сети у позвоночных: появление примерно 300 млн лет назад первого класса высших позвоночных — рептилий; и далее появление теплокровных позвоночных — птиц и млекопитающих, а это связано не только с более развитой системой микроциркуляции, но и с иным качеством симпатической нервной регуляции. При этом живородящие млекопитающие имеют более сложную систему микроциркуляции, чем птицы — более поздние потомки рептилий.

*Иммунные механизмы и воспаление.* Круглоротые рыбы имеют кровь, включающую эритроциты и различные популяции лейкоцитов (гранулоциты, моноциты, лимфоцитоподобные клетки) и способны к острофазному ответу на травмы и инфекции [110]. Однако лимфоидные клетки не имеют Т-клеточного рецептора, не продуцируют иммуноглобулины (Ig), но у них есть экспрессия RAG генов, а также растворимые и рецепторные продукты двух варибельных генов лимфоидных клеток (VLR), не имеющих гомологов у челюстных позвоночных [37, 41]. Таким образом, круглоротые прошли только начальные этапы формирования механизмов адаптивного иммунитета.

Вероятно, в конце кембрия происходила массовая гибель большого числа видов позвоночных от инфекции. Следствием чего после решения проблемы питания возникла проблема сохранения новых органических систем от микробов и их токсинов, способных быстро распространяться по кровеносной системе. Эта проблема решалась формированием сложных программ воспаления и адаптивного иммунитета. Полностью реализовать эту

задачу смогли предки челюстных позвоночных. Это потребовало существенного усложнения генома, а преимущества проявили себя не сразу — по мере появления новых, более высокоорганизованных видов хрящевых, а затем и костистых рыб и их наземных потомков.

Костистые рыбы имеют лимфоидные органы, все основные популяции лейкоцитов и субпопуляции лимфоцитов: нормальные киллеры,  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-лимфоциты [121], близкие по функции к Т-хелперам (Th) и цитотоксическим Т-лимфоцитам млекопитающих, В-лимфоциты, секретирующие IgM и обладающие, как у земноводных и рептилий, фагоцитарной активностью [31]. Земноводные и рептилии дополнительно имеют класс антител вторичного иммунного ответа — IgY, близкий по функции к IgG млекопитающих, а в качестве секреторных антител используют IgM; птицы — IgM, IgY, IgA; млекопитающие — IgM, IgA, IgE и несколько подклассов IgG с выраженной функциональной дифференциацией [31]. В отличие от млекопитающих, провоспалительная роль Th у других классов позвоночных детально не изучена, но так или иначе связана с фагоцитами и продукцией цитокинов. Так, лимфоцитоподобные клетки миног способны секретировать ключевые для развития продуктивного воспаления цитокины — IL-17 и MIF, также их активированные клетки могут секретировать IL-1, IL-6 и хемокины двух подсемейств — CC и CXC (включая IL-8), а также присутствующий всем позвоночным цитокиноподобный DAMP — HMGB1 [37, 55, 86]. Костистые рыбы имеют широкий спектр CC и CXC хемокинов, TNF $\alpha$ , INF $\alpha, \beta, \gamma$ , некоторые ростовые факторы (но не CSF и IL-3), TGF $\beta$ , MIF, IL-1 $\alpha/\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-18, IL-20, IL-24, но у них не выявлены цитокины Th2-ряда (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) и многие другие цитокины млекопитающих [122, 123]. У рептилий и птиц цитокиновая сеть более развита, чем у рыб, но менее чем у млекопитающих.

У млекопитающих иммунный ответ наиболее дифференцирован в зависимости от антигенной стимуляции и состояния организма за счет наличия большого числа классов и подклассов антител и субпопуляций Th, секретирующих различный спектр цитокинов [4, 18, 64, 65, 72, 74]. При этом в очаге воспаления происходит кооперация различных субпопуляций макрофагов (M $\phi$ ) и других фагоцитов, с одной стороны, и Th, — с другой. Так, классическая активация M $\phi$  1-го типа (M1) связана с Th1 (INF $\gamma$ ; TNF $\alpha/\beta$ , IL-2 и др.); M1 активно секретируют TNF $\alpha$ ; эффективны против внутриклеточных паразитов за счёт протеиназ и CP, через IL-12 и IL-18 способствуют генерации и активации Th1. При гиперактивации M1 и гиперфункции регуляторных Т-клеток Th3/Treg (TGF $\beta$ , IL-10) M1 могут трансформироваться в M $\phi$ -супрессоры (IL-10, TNF $\alpha$ ) [18, 65, 72].

Провоспалительные Мф на фоне внеклеточной инфекции могут также активироваться IgG-иммунными комплексами; они экспрессируют значительное количество Fc-рецепторов к агрегированным IgG (FcγR) и различные типы CR, а также связанные с клеточным стрессом TLR4 и другие ПРР [65, 72]. Эти Мф не являются классическими M1; они способны секретировать как типично провоспалительные (IL-1β, TNFα, IL-6, LTB<sub>4</sub>), так и супрессорные (IL-10, IL-1ra, PGE<sub>2</sub>) медиаторы. В очаге воспаления эти Мф могут взаимодействовать с нейтрофилами и Th17 (IL-17; TNFα, IL-22, INFγ и др.), а при супрессорной трансформации — с Treg [18, 22, 64]. При супрессии фагоцитов может отмечаться выраженная экссудативно-сосудистая реакция за счёт PGE<sub>2</sub> и других механизмов. При внеклеточной инфекции Th22 участвуют в регенерации и склерозировании покровных тканей (IL-22; TNFα, ростовые факторы и др.) [18]. Провоспалительные Мф, нейтрофилы, Th1 и Th17 вовлекаются в развитие аутоиммунного воспаления и отторжение аллотрансплантата [4, 18].

Альтернативная активация Мф 2-го типа (M2) связана с Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 и др.) и близких им по функции, а в некоторых случаях и происхождению, Th5 (IL-5), Th6 (IL-6), Th9 (IL-9) [18, 65, 72]. В свою очередь, выделяют несколько подтипов M2 (a,b,c,d), включая супрессорные Мф (IL-10) [65]. В целом, M2 обладают умеренной воспалительной активностью, по-разному продуцируют IL-1β, IL-6, IL-10, TGFβ, IL-1ra, ростовые факторы, PGE<sub>2</sub>, как правило [18, 65, 72], слабо экспрессируют FcγR, CR и TLR, но сильно — не индуцирующие клеточный стресс ПРР (С-лектины, рецепторы-«мусорщики», рецепторы к компонентам экстраклеточного матрикса); обмен аргинина больше направлен не на образование NO, а на продукцию компонентов коллагена (пролин, оксипролин). M2 имеют большое значение для регенерации и склерозирования тканей при хронизации воспаления. Кроме того, при метазойной инфекции и некоторых вариантах аллергического процесса M2, IgE и Th2 участвуют в образовании эозинофильных инфильтратов (Th2 — через IL-5, IL-13) и активации тучных клеток (IL-4, IL-13) [18, 77].

Повреждённые эпителий, эндотелий посткапилляров и клетки соединительной ткани через IL-33 активируют генерацию Th2 и продукцию у них IL-4, IL-5 и IL-13, кроме того, IL-33 сам способствует дегрануляции тучных клеток и базофилов, а также миграции нейтрофилов в очаг воспаления [18, 74].

Приоритетную роль в обеспечении антителиогенеза во вторичных лимфоидных органах играют фолликулярные Th (Tfh), которые в значительных количествах продуцируют IL-21, а также IL-6 и различные цитокины Th1 и Th2 ряда [17, 30, 82]. Между тем, Th2 играют ключевую роль при ориентации гуморального иммунного ответа в направлении IgE-продукции [116].

В моделях *in vitro* генерация Th1 и Th2 носит конкурентный характер, но *in vivo* возможна и синергия между ними [104]; это касается и цитокинов — их разделение на провоспалительные и противовоспалительные до определенной степени условно [18, 93].

В целом, развитие классического воспаления, зависит от состава клеточного инфильтрата (прежде всего, фагоцитов и Т-клеток). В свою очередь, это определяет стадии и варианты процесса: гнойное или экссудативно-деструктивное воспаление (ЭДВ) (основные эффекторы — нейтрофилы, комплемент и IgG) и различные виды продуктивного воспаления (все типы фагоцитов и лимфоцитов). В отдельных случаях происходит экстраполяция различных вариантов воспаления, например, при послойном формировании стенки хронического абсцесса.

*Особенности воспалительного процесса у позвоночных.* В настоящее время исследованы инфекционно-воспалительные процессы у рыб [52, 96, 115], земноводных [70, 98], рептилий [39, 47, 71, 112], птиц [39, 59, 66, 71, 108] и млекопитающих [4, 12, 18, 71, 94]. Данные этих исследований можно сопоставить в ряду: рыбы — земноводные — рептилии — птицы — млекопитающие:

1. Лейкоциты крови: преобладание мононуклеаров (до 90—99% у рыб) сменяется преобладанием гранулоцитов у млекопитающих; снижается общий уровень лейкоцитов крови, но возрастает значение вторичных лимфоидных органов и процессов рециркуляции лимфоцитов.

2. Последовательно возрастает чувствительность к повреждению внутренних органов и снижается скорость регенерации покровных тканей: у рыб высокая регенерация вне зависимости от температуры, у земноводных и рептилий она зависит от температуры, у млекопитающих — меньше чем у других классов. Начиная с рептилий, при тяжёлых повреждениях возникает необходимость в склерозировании тканей; у млекопитающих интенсивность рубцовых замещений максимальна.

3. У рыб и земноводных в очаге воспаления преобладают продуктивные процессы и менее выражены экссудативно-сосудистые. Начиная с земноводных, продуктивное воспаление может дифференцироваться по характеру доминирующего состава клеточного инфильтрата: мононуклеары, эозинофилы, смешанный тип — из мононуклеаров и гетерофилов (нейтрофилов у млекопитающих). У рептилий и, особенно, птиц встречаются варианты ЭДВ в виде творожистого воспаления; для млекопитающих характерно развитие ЭДВ с образованием жидкого гноя. Для гетерофилов рептилий и птиц характерно отсутствие миелопероксидазы (хотя этот фермент обнаруживается у рыб) и низкая способность продуцировать СР. У млекопитающих высокие концентрации СР во внеклеточной среде, инактивируя элины и другие тканевые антипротеиназы, открывают дорогу тканевому расплавлению в условиях массовой дегрануляции нейтрофилов. Вероятная причина феномена

— недостаточная возможность у птиц и рептилий ограничить очаг ЭДВ за счёт процессов экссудативно-сосудистого комплекса (ЭСК).

4. Системные инфекции проявляются у рыб и земноводных микробной колонизацией внутренних органов, некрозами, повреждениями сосудов, кровоизлияниями. У рептилий — множественными гранулёмами во внутренних органах, а при внеклеточных инфекциях — с примесью гетерофилов, поражениями сердца, центральной нервной системы (ЦНС), нарушениями дыхания, координации движения, судорогами. У птиц генерализованная инфекция также проявляется вторичной микробной колонизацией, часто поражается эндокард и миокард, отмечаются фибринозные отложения в тканях; основные причины смерти — тромбоэмболии в жизненно важных органах и септический эндокардит. Между тем, у птиц, так же как у млекопитающих, может отмечаться дистресс-реакция ЦНС, лихорадка и выраженный острофазный ответ, а в некоторых случаях и развитие сосудистого шока при травмах и инфекциях. В то же время, у млекопитающих вторичная колонизация внутренних органов не является атрибутивным условием летального исхода при инфекции; напротив, микроциркуляторные расстройства являются доминирующим патогенетическим фактором критических состояний.

Часто системные инфекции у животных всех классов позвоночных, несмотря на различия патогенеза, определяют как «септический процесс». Мы же в очередной раз ставим вопрос — что есть сепсис?

У млекопитающих системные и локальные воспалительные процессы изучены лучше. Во многих случаях определены и межвидовые различия этих процессов. Однако эти различия менее принципиальны в сравнении с различиями между млекопитающими и другими классами позвоночных. В частности, при моделировании экспериментального септического шока грызуны, кошки и собаки более устойчивы к действию LPS, в сравнении с приматами, кроликами и овцами [34]. Овцы и телята в сравнении с приматами, собаками и крысами, отвечают отёком лёгких на более низкие дозы LPS, по-видимому, вследствие более высокого содержания стромальных макрофагов в микрососудах альвеол [10]. В целом, эксперименты на различных видах млекопитающих дают представление о конкретных компонентах септического процесса, но они не могут по-настоящему имитировать сложность и внутреннюю неоднородность клинического сепсиса [34].

Также особенностью высокоорганизованных животных является наличие у них тканей, чувствительных к факторам клеточного стресса, в частности нейтронов ЦНС [67, 92] и инсулинопродуцентов [83]. Возможно, в этом же заключается одна из причин развития диффузного склероза внутренних органов при ряде заболеваний, ассоциированных с хроническим системным воспалением (СВ) [1, 113].

В целом, у млекопитающих более существенную роль в воспалительном процессе и развитии критических осложнений играют механизмы ЭСК, поэтому остановимся на их становлении у позвоночных.

### Эволюция отдельных составляющих экссудативно-сосудистого комплекса у позвоночных

Поскольку мы уже рассматривали систему микроциркуляции здесь и ранее [3], далее остановимся на системах комплемента, гемостаза, кининогенеза и тучных клетках как APUD-системе ЭСК.

*Система комплемента* — одна из немногих систем врождённого иммунитета, получившая существенное развитие у позвоночных [79, 80]. Степень гомологии факторов С-комплемента у круглоротых и млекопитающих относительно невелика, порядка 30-50%. При этом круглоротые имеют альтернативный и лектиновый (PAMP + MBL + MASP<sub>1,2</sub> → C2C4 → C3) пути активации [79, 80, 110]. Факторы лектинового пути (MASP<sub>1,2</sub>) способны катализировать образование фибриновых сгустков при воспалении, дублируя эффекты тромбина, ф. Ха и ф. XIIIa [36].

Челюстные рыбы имеют более совершенную систему комплемента [79, 80]: сформировавшийся мембраноатакующий комплекс (C5-C9), анафилаксыны (C3a, C4a, C5a), более разнообразный репертуар CR на фагоцитах и мастоцитах, классический путь активации через факторы C1q,r,s. При этом C1q функционирует первоначально только как опсонин, затем при участии C1r и C1s стал взаимодействовать с C2C4, а активироваться IgM (классический путь) и СРБ. При этом альтернативный путь у рыб играет не меньшую роль, чем C2C4-зависимые пути, он может эффективно функционировать и при низкой температуре. У костистых рыб также появилось значительное число ингибиторов комплемента, предотвращающих его агрессию в отношении собственных клеток.

У млекопитающих отмечается более тесная интеграция комплемента в ЭСК [4, 27, 94, 125]: возрастает репертуар комплементсвязывающих рецепторов на эндотелиоцитах, тромбоцитах и мастоцитах; анафилаксыны (C3a и C5a) образуются в жидкой фазе в результате действия на C3 и C5 сериновых протеиназ фагоцитов, анионов гипохлорной кислоты, калликреина, плазмина, тромбина, Ха, XIa, и опосредованного действия фактора Хагемана (XIIa) через активацию C1q. В очаге гнойного воспаления у млекопитающих для активации нейтрофилов играет роль симбиоз комплемента и IgG, соответственно, CR и FcγRIII [4, 94]. Несомненно, участие внутрисосудистой активации комплемента при развитии шоковых состояний у млекопитающих. При этом анафилаксыны не могут без вовлечения системы гемостаза вызвать трансформацию эндотелия, но в эксперименте быстрое накопление в крови C5a может активировать депониру-



ванные в микрососудах альвеол нейтрофилы с развитием отёка легких [119]. При некоторых иммунокомплексных заболеваниях развивается хронический вариант СВ [1].

*Система гемостаза и кининогенеза.* Система гемостаза появилась у первых позвоночных и изначально выполняла две взаимосвязанные функции — остановку кровотечения и развитие воспаления [23, 48]. Уже клуглоротые рыбы имеют ф. XIII и факторы внутреннего пути свёртывания крови в несколько упрощенном виде (в частности, отсутствует звено усиления — ф. VIII + ф. IX) [61]. Челюстные рыбы имеют уже 10 основных факторов этого пути: пять протеаз — протромбин, ф. X, ф. IX, ф. VII, протеин C и их кофакторы — тканевой фактор (TF), ф. V, ф. VIII, тромбомодулин, протеин S, а также антитромбин III и сложную систему активации плазминогена, включая урокиназу и тканевой активатор плазминогена,  $\alpha_2$ -антиплазмин [23, 48, 61]. Активность факторов гемостаза и тромбообразования возрастает в ряду рыбы < амфибии < рептилии < птицы < млекопитающие. В частности, у птиц, в сравнении с млекопитающими, существенно меньше в плазме крови запускающих факторов: V, VII, а при повреждении и растворимой формы TF, отсутствует и внутрисосудистый путь активации через XIIIa [23, 61].

Для формирования ЭСК необходима взаимная активация системы гемостаза и эндотелиоцитов. У круглоротых и хрящевых рыб эндотелий, по-видимому, может активироваться продуктами деградации фибрина. Однако у костистых рыб на эндотелиоцитах, мастоцитах и тромбоцит-подобных клетках появляется конститутивный рецептор к тромбину — протеиназами активируемый рецептор 1 (PAR<sub>1</sub>) [28]. Этот рецептор активируется частичным протеинолизом: выражено — тромбином, а также плазмином, ф. Ха, ф. VIIIa и металлопротеиназами тромбоцитов у млекопитающих. У млекопитающих действие на PAR<sub>1</sub> может инициировать сокращение актиновых микрофиламентов цитоскелета, изменение формы эндотелиоцитов и образование зазоров между ними [13]. Этот процесс протекает преимущественно в области посткапилляров и лежит в основе экссудативной реакции [3, 4].

Рыбы и земноводные имеют в крови кининоген [23]. Он расщепляется протеиназами при индукции воспаления с образованием брадикинина. У рептилий на фоне более высокоорганизованной системы микроциркуляции появляется калликреин-кининовая система — калликреиноген и высокомолекулярные кининогены (ВМК), дающие более широкий спектр кининов [23, 99, 101]. Одновременно у рептилий появляется ф. Хагемана (XII) в качестве растворимой формы ПРР — распознаёт LPS, коллаген и некоторые другие продукты тканевого распада, полифосфаты, инородную поверхность [23, 61, 101]. Он наряду с некоторыми другими сериновыми протеиназами катализирует образование калликреина [4, 23, 99].

Внутренний путь активации системы гемостаза сформировался у млекопитающих с появлением ф. XI, который активируется XIIIa при участии ВМК [23, 99, 101]. Одновременно XIIIa и плазмин взаимно активируют друг друга. Наличие ф. XIIIa не является атрибутивным условием тромбообразования и кининогенеза, поскольку у птиц и морских млекопитающих его ген редуцирован [23]. Вероятно, ф. Хагемана повышает степень избыточности механизмов, связывающих процессы гемостаза, тромболиза и кининогенеза при воспалении.

*Тромбоциты* как кровяные пластинки являются отличительным признаком млекопитающих [102]. У других классов позвоночных, наряду с ядросодержащими эритроцитами, имеются и ядросодержащие тромбоциты (ЯСТ). Обычно это яйцеобразные клетки размером 6—8 мкм, с небольшим ядром, в количестве 20—60 тыс./мкл крови. У рыб при гипоксии ЯСТ могут насыщаться гемоглобином. Активируются ЯСК эндогенными и экзогенными DAMP, действующими на ПРР, включая TLR. При активации ЯСТ могут образовывать двухмерные столбики и фиксироваться в таком виде на оголённой базальной мембране при повреждении сосудов, но трёхмерные структуры, характерные для тромбоцитарных тромбов, не образуют [102]. У ЯСТ плотность  $\alpha$ IIb/ $\beta$ 3 и  $\alpha$ 2/ $\beta$ 1 интегринов на порядок ниже в сравнении с тромбоцитами млекопитающих, у них также отсутствует ключевой коллаген-распознающий рецептор — GP VI суперсемейства иммуноглобулинов и ряд других рецепторных структур [102]. ЯСК птиц активируются тромбином и коллагеном, но скорость активации и агрегации у них существенно ниже, чем у тромбоцитов. Они также не способны агрегироваться в ответ на воздействие адреналина и медиаторов обратной связи — серотонина, ТХА<sub>2</sub> и АДФ.

Тромбоциты являются не только факторами гемостаза, но и фагоцитами — вероятно, они произошли от гранулоцитарных гемоцитов [81, 102]. Так, тромбоциты млекопитающих конститутивно экспрессируют большой набор рецепторов, участвующих в фагоцитозе, а именно: ПРР — TLR (1, 2, 4, 6, 9), CD36, рецепторы к формилпептидам, СРБ, C1q и C3bi комплемента, IgG (Fc $\gamma$ RII) и IgE (Fc $\epsilon$ RI) [81, 114]. При фагоцитозе микробов тромбоциты образуют агрегаты [81, 130].

Тромбоциты имеют рибосомы и определённое количество мРНК, но основное количество секретируемых ими факторов выделяется из депо [81, 114, 130]. Так, тромбоциты содержат лизосомы с большим набором гидролаз ( $\lambda$ -гранулы), имеют НАДФ-оксидазу, продуцируют СР (но не NO, которая их дезактивирует) [32].

Активируют тромбоциты различные факторы: эндогенные DAMP (особенно коллаген) и микробные PAMP, иммунные комплексы, АДФ, ТХА<sub>2</sub>, гистамин, серотонин, катехоламины, анафилаксины — С3a и С5a, тромбоцитактивирующий фактор, тромбин, СР,

цитокины (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ ), IL-8 и другие хемокины через рецепторы — CCR(1-5), CXCR(1, 2, 4) [4, 9, 32, 81, 106, 114, 130]. При активации происходит дегрануляция тромбоцитов: вначале плотные тельца —  $\delta$ -гранулы (серотонин, кальций, АДФ) и  $\alpha$ -гранулы (>100 белков, включая P-селектин и интегрины) и в последнюю очередь —  $\lambda$ -гранулы (протеиназы, гликозидазы, катионные белки). Среди секретируемых белков можно выделить:

- факторы гемостаза: фибриноген, TF, ВМК, ф. V, ф. VII, ф. XI, ф. XIII, протеин S, плазминоген,  $\alpha$ 2-антиплазмин, ингибитор активаторов плазминогена 1 (PAI-1), урокиназу (u-PA), тромбоцитарный ингибитор TF (TFPI);
- антипротеиназы:  $\alpha$ 1-антитрипсин,  $\alpha$ 2-макроглобулин, C1-ингибитор;
- цитокины: TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF $\alpha$  и TGF $\beta$ , HMGB1;
- хемокины — CXCL: 1 (GRO- $\alpha$ ), 2 (MIP-2), 4 (TF4), 5 (ENA-78), 6 (LIX), 7 ( $\beta$ -TG, NAP-2), 8 (IL-8), 12 (SDF-1 $\alpha$ );
- хемокины — CCL: 2 (MCP-1), 3 (MIP-1 $\alpha$ ), 5 (RANTES), 7 (MCP-3), 17 (TARC);
- растворимую и рецепторную формы CD40L (представитель семейства TNF, активирует эндотелициты и другие CD40<sup>+</sup> клетки);
- ростовые факторы: PDGF(a,b,c), EGF, VEGF(a,c), IGF-1, HGF, FGF-2, CTGF, BMP(2,4,6), ангиопоэтин-1 и др.;
- молекулы адгезии: фибронектин, витронектин, остеоонектин, тромбоспондин, ламинин, ф. Виллебранда;
- бактерицидный катионный белок  $\beta$ -лизин [4, 9, 32, 81, 106, 114, 130].

Цитокины тромбоцитов действуют локально; при диссеминированном внутрисосудистом свёртывании (ДВС) возможно накопление в крови TGF $\beta$ , TF4 и, по-видимому, некоторых других хемокинов.

За обратимую кальцийзависимую агрегацию тромбоцитов отвечают P-селектины, а за необратимую — преимущественно  $\beta$ 1 и  $\beta$ 3-интегрины [114, 130]. Активированные тромбоциты могут фиксироваться не только на базальной мембране, но и на эндотелиоцитах, и агрегироваться с лейкоцитами [131].

Основные функции тромбоцитов при воспалении [4, 9, 81, 114, 130]:

- 1) участие в начальных этапах формирования очага воспаления — ЭСК, миграции (через хемокины) и преактивации мигрирующих лейкоцитов;
- 2) фиксация, фагоцитоз и частичное уничтожение микробов, проникших в сосудистую систему, с окончательной утилизацией тромбоцитарных агрегатов макрофагами сосудов;
- 3) выделение в системный кровоток опсонинных, бактерицидных агентов и факторов гемостаза;

4) формирование посредством микротромбообразования барьерной функции ЭСК при развитии ЭДВ;

5) участие в процессах тканевой регенерации и репарации;

6) при СВ — развитие ДВС [43, 90, 128], но и усиление противовоспалительной резистентности за счёт поддержания высокого уровня в крови TGF $\beta$  [60].

*Тучные клетки* (ТК) как компонент APUD-системы ЭСК обнаруживаются уже у круглоротых рыб и распространяются, как и у других позвоночных, преимущественно около микрососудов кожи и слизистых оболочек [20]. Гранулы ТК у рыб преимущественно содержат лизоцим, серотонин, гепарин, гликозидазы, бактерицидные пептиды, нуклеозидазы, фосфатазы и отдельные сериновые протеиназы, способствующие изменению межклеточного вещества и миграции клеток из сосудов. Между тем, гранулированные гемоциты, содержащие гистамин и гепарин, обнаруживаются и у некоторых ВО-БПЖ (отдельных видов асцидий и членистоногих) [20]. Уже у костистых рыб ТК секретируют при активации индикаторные для них ферменты — химазы и триптазу, опосредующие широкий спектр протеолитических и регуляторных эффектов, в том числе действие триптазы через PAR<sub>2</sub> на эндотелиоциты, некоторые типы клеток эпителия (в частности, кишечника) и аутокринно на ТК, но большая концентрация триптазы дезактивирует PAR<sub>2</sub> [20, 120]. У млекопитающих этот рецептор также преимущественно связан с этими типами клеток, отсутствует на тромбоцитах, но в определённых количествах конститутивно экспрессируется и на многих других клетках, включая нейроны [120].

У некоторых костистых рыб отряда окунеобразных ТК продуцируют гистамин; у них обнаруживается и пептидный активатор дегрануляции ТК — гистамин-релизинг-фактор (ГРФ) (продуцируется эндотелиоцитами, макрофагами, лейкоцитами), а также 3 типа гистаминсвязывающих рецепторов (HR) [75]. Высокие концентрации экзогенного гистамина смертельны для этих рыб. Причина смерти связана со спазмом жаберных сосудов (действие через HR-2) [75]. Для земноводных наличие гистамина в ТК не характерно, но они выделяют ГРФ как компонент кожного яда [15]. Несомненно, гистамин как фактор эксудативных реакций проявляет себя у рептилий, птиц и максимально у млекопитающих [8, 75].

Активируются ТК эндогенными DAMP и PAMP через PRR (включая рецептор к LPS — TLR4), тромбином, анафилаксинами комплемента, гипоксией, изменениями pH, механическими воздействиями, цитокинами, эйкозаноидами, ГРФ [4, 8, 69, 118]. У млекопитающих появляется и наиболее мощный антигенспецифичный фактор активации ТК — IgE и высокоаффинный рецептор Fc $\epsilon$ RI, связывающий мономерные IgE на поверхности ТК [4, 8, 118]. Этот механизм опосредует повышенную чувствительность

немедленного типа (ПЧНТ) и её системную составляющую — анафилактический шок.

У млекопитающих ТК интегрируются в цитокиновую сеть, реагируя на цитокины: IL-2-6, IL-9-11, IL-33, SCF, TNF $\alpha$  и секретируя цитокины при активации: IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-33, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$  и GM-CSF, т.е. преимущественно относящихся к Th2-ряду [44, 46, 68, 129]. В очаге воспаления ТК могут активно взаимодействовать с эозинофилами и Th2 при развитии замедленной фазы ПЧНТ [8, 46, 69]. При системных процессах роль ТК в развитии феномена гиперцитокинемии не определяющая. Однако быстрое повышение уровня TNF $\alpha$  в крови может быть связано с его мобилизацией из депо в ТК [8, 69]. Кроме того, ТК являются ключевыми продуцентами цистеиниловых лейкотриенов (LTC $_4$ , LTD $_4$ , LTE $_4$ ), которые инициируют бронхоспазм и экссудативно-сосудистую реакцию в очаге воспаления [8, 118].

Таким образом, у позвоночных развитие отдельных составляющих ЭСК происходило постепенно и достигло максимальной эффективности у млекопитающих. С одной стороны, это оптимизировало развитие местных проявлений воспалительного процесса, но с другой, — млекопитающие столкнулись с проблемой микроциркуляторных расстройств при системном действии повреждающих факторов.

### Заключение

Все беспозвоночные животные имеют, в той или иной степени развития, клеточно-гуморальную систему врождённого иммунитета. Они способны изолировать паразитов и инородные тела с помощью фагоцитов и других клеток по типу гранулематозной реакции позвоночных. У многих высокоорганизованных беспозвоночных при инфекции и повреждении отмечается ряд характерных признаков СВР: повышение в гемолимфе СРБ и других острофазных белков, фагоцитов и стресс-индуцируемых эндокринных факторов. Однако весь комплекс атрибутивных патофизиологических механизмов воспаления имеется только у позвоночных в связи с появлением у них развитой системы микроциркуляции. Все составляющие экссудативно-сосудистого комплекса у позвоночных последовательно прогрессировали от рыб до млекопитающих одновременно с развитием цитокиновой сети и системы адаптивного иммунитета при снижении интенсивности регенеративных процессов и, начиная с рептилий, увеличения роли заместительного склерозирования. Летальная, системная инфекция выявляется у всех позвоночных. О наличии СВ как общепатологического процесса, связанного с микроциркуляторными расстройствами, можно утверждать только в отношении млекопитающих. Также возможны отдельные проявления СВ и у птиц, но они не очевидны у

рептилий. Возможность развития СВ как целостного процесса у млекопитающих связана с высоким уровнем реакции экссудативно-сосудистого комплекса на действие растворимых факторов повреждения и наличием жизненно важных органов высокочувствительных к микроциркуляторным расстройствам.

*Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории иммунологии воспаления Института иммунологии и физиологии УрО РАН к.б.н. Ю.А. Журавлёвой и к.б.н. Н.В. Зотовой за помощь в подготовке статьи к печати*

### Список литературы

1. Гусев Е.Ю., Черешнев В.А., Журавлёва Ю.А. и др. Варианты развития хронического системного воспаления // Мед. иммунол. — 2009. — Т. 11, №2-3. — С. 131-140.
2. Гусев Е.Ю., Черешнев В.А. Системное воспаление: предпосылки несиндромального подхода // Пат. физиол. и экспер. терапия. — 2012.
3. Гусев Е.Ю., Черешнев В.А. Системное воспаление: теоретические и методологические подходы к описанию модели общепатологического процесса. Часть 1. Общая характеристика процесса // Пат. физиол. и экспер. терапия. — 2012. — №4. — С. 3-14.
4. Молекулярные механизмы воспаления: Учебное пособие / Под ред. акад. РАН Черешнева В.А. — Екатеринбург: УрО РАН, 2010.
5. Abele D., Puntarulo S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defense systems in polar and temperate marine invertebrates and fish // Comp. Biochem. Physiol. — 2004. — Vol. 138. — P. 405-415.
6. Aird W.C. Endothelial cell heterogeneity // Crit. Care Med. — 2003. — Vol. 31, №4. — P. 221-230.
7. Bayne C.J. Origins and evolutionary relationships between the innate and adaptive arms of immune systems // Integr. Comp. Biol. — 2003. — Vol. 43, №2. — P. 293-299.
8. Beghdadi W., Madjene L.C., Benhamou M. Mast cells as cellular sensors in inflammation and immunity // Front. Immunol. — 2011. — Vol. 2. — P. 37-52.
9. Bendinelli P., Matteucci E., Dogliotti G. et al. Molecular basis of anti-inflammatory action of platelet-rich plasma on human chondrocytes: mechanisms of NF- $\kappa$ B inhibition via HGF // J. Cell Physiol. — 2010. — Vol. 225, №3. — P. 757-766.
10. Berczi I., Bertok L., Bereznai T. Comparative studies on the toxicity of Escherichia coli lipopolysaccharide endotoxin in various animal species // Can. J. Microbiol. — 1966. — Vol. 12, №5. — P. 1070-1071.
11. Beschina A., Bilejb M., Torreelea E., De Baetseliera P. On the existence of cytokines in invertebrates // Cell. Mol. Life Sci. — 2001. — Vol. 58. — P. 801-814.
12. Black S., Kushner I., Samols D. C-reactive protein // J. Biol. Chem. — 2004. — Vol. 279, №47. — P. 48487-48490.
13. Bogatcheva N.V., Garcia J.G.N., Verin A.D. Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability // Biochemistry (Moscow). — 2002. — Vol. 67, №1. — P. 75-84.
14. Cecon S., Minnich B., Lametschwandner A. Vascularization of the brains of the Atlantic and Pacific hagfishes, Myxine glutinosa and Eptatretus stouti: a scanning electron microscope study of vascular corrosion casts // J. Morphol. — 2002. — Vol. 253, №1. — P. 51-63.
15. Chen T., Reid C.N., Walker B. et al. Kassinakinin S: a novel histamine-releasing heptadecapeptide from frog (Kassina senegalensis) skin secretion // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2005. — Vol. 337, №2. — P. 474-480.

16. **Christensen C., Thakar J., Albert R.** Systems-level insights into cellular regulation: inferring, analysing, and modelling intracellular networks // *IET Syst. Biol.* — 2007. — Vol. 1, №2. — P. 61-77.
17. **Chtanova T., Tangye S.G., Newton R.** et al. T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells // *J. Immunol.* — 2004. — Vol. 173. — P. 68-78.
18. Cytokines and chemokines in infectious diseases handbook / Kotb M. (Ed.), Calandra T. (Ed.). — Humana Press, 2010.
19. **Clarkson E.N.K.** Invertebrate Palaeontology & Evolution. — Wiley-Blackwell, 1998.
20. **Crivellato E., Ribatti D.** The mast cell: an evolutionary perspective // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* — 2010. — Vol. 85, №2. — P. 347-360.
21. **Dinan L., Lafont R.** Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals // *J. Endocrinol.* — 2006. — Vol. 191, №1. — P. 1-8.
22. **Dong C.** TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming // *Nat. Rev. Immunol.* — 2008. — Vol. 8, №5. — P. 337-348. *Nat. Rev. Immunol.* — 2008. — Vol. 8, №. 5. — P. 337-348.
23. **Doolittle R.F.** Coagulation in vertebrates with a focus on evolution and inflammation // *J. Inn. Immun.* — 2010. — Vol. 3. — P. 9-16.
24. **Dreyfus D.H.** RAG-1 (Recombination Activating Gene-1) protein is closely related to herpes virus recombinases: Implications for the origins of the acquired immune system // *J. Immunol.* — 2012. — Vol. 188. — P. 105-120.
25. **Du Rose J.B., Tam A.B., Niwa M.** Intrinsic capacities of molecular sensors of the unfolded protein response to sense alternate forms of endoplasmic reticulum stress // *Mol. Biol. Cell.* — 2006. — Vol. 17, №7. — P. 3095-3107.
26. **Dubois M.P.** Immunocytochemistry of polypeptide hormones: a review // *Acta Histochem. Suppl.* — 1980. — Vol. 22. — P. 141-177.
27. **Ehrthaller C., Ignatius A., Gebhard F., Huber-Lang M.** New insights of an old defense system: structure, function and clinical relevance of the complement system // *Mol. Med.* — 2011. — Vol. 17, №3-4. — P. 317-329.
28. **Ellersdottir E., Berthold P.R., Bouzaffour M.** et al. Developmental role of zebrafish protease-activated receptor 1 (PAR1) in the cardio-vascular system // *PLoS ONE.* — 2012. — Vol. 7. — e42131.
29. **Evans D.H., Piermarini P.M., Choe K.P.** The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste // *Physiol. Rev.* — 2005. — Vol. 85. — P. 97-177.
30. **Fazilleau N., Mark L., McHeyzer-Williams L.J.** et al. Follicular helper T cells: lineage and location // *Immunity.* — 2009. — Vol. 30, №3. — P. 324-335.
31. **Flajnik M.F., Miller K.M., Du Pasquier L.** Evolution of the immune system / Paul W.E., ed. — Fundamental immunology. 5th ed. — Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2003. — P. 519-570.
32. **Forde R.C., Fitzgerald D.J.** Reactive oxygen species and platelet activation in reperfusion injury // *Circulation.* — 1997. — Vol. 95. — P. 787-789.
33. **Fritz G., Kaina B.** Late activation of stress kinases (SAPK/JNK) by genotoxins requires the DNA repair proteins DNA-PKcs and CSB // *Mol. Biol. Cell.* — 2006. — Vol. 17, №2. — P. 851-861.
34. **Garrido A.G., de Figueiredo L.F.P., e Silva M.R.** Experimental models of sepsis and septic shock: an overview // *Acta Cir. Bras.* — 2004. — Vol. 19, №2. — P. 82-88.
35. **Gasser B., Saloheimo M., Rinas U.** et al. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview // *Microb. Cell Fact.* — 2008. — Vol. 7, №11 — DOI: 10.1186.
36. **Gulla K.C., Gupta K., Krarup A.** et al. Activation of mannan-binding lectin-associated serine proteases leads to generation of a fibrin clot // *Immunology.* — 2010. — Vol. 129, №4. — P. 482-495.
37. **Guo P., Hirano M., Herrin B.R.** et al. Dual nature of the adaptive immune system in lampreys // *Nature.* — 2009. — Vol. 459, №11. — P. 796-801.
38. **Gupta A.P., Han S.S.** Arthropodimmunesystem. III. Septate junctions in the hemocytic capsule of the german cockroach, *Blattella germanica* // *Tissue Cell.* — 1988. — Vol. 20, №4. — P. 629-634.
39. **Harmon B.G.** Avian heterophils in inflammation and disease resistance // *Poultry Science.* — 1998. — Vol. 77. — P. 972-977.
40. **Hartenstein V.** The neuroendocrine system of invertebrates: a developmental and evolutionary perspective // *J. Endocrinol.* — 2006. — Vol. 190. — P. 555-570.
41. **Herrin B.R., Cooper M.D.** Alternative adaptive immunity in jawless vertebrates // *J. Immunol.* — 2010. — Vol. 185, №3. — P. 1367-1374.
42. **Hibino T., Loza-Coll M., Messier C.** et al. The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome // *Dev. Biol.* — 2006. — Vol. 300, №1. — P. 349-365.
43. **Hong K.H., Kim H.K., Kim J.E.** et al. Prognostic value of immature platelet fraction and plasma thrombopoietin in disseminated intravascular coagulation // *Blood Coagul. Fibrinolysis.* — 2009. — Vol. 20, №6. — P. 409-414.
44. **Hsu C.-L., Neilsen C.V., Bryce P.J.** IL-33 is produced by mast cells and regulates IgE dependent inflammation // *PLoS ONE.* — 2010. — Vol. 5, №8. — e11944.
45. **Hughes A.L.** Protein phylogenies provide evidence of a radical discontinuity between arthropod and vertebrate immune systems // *Immunogenetics.* — 1998. — Vol. 47, №4. — P. 283-296.
46. **Hultner L., Kolsch S., Stassen M.** et al. In activated mast cells, IL-1 up-regulates the production of several Th2-related cytokines including IL-9 // *J. Immunol.* — 2000. — Vol. 164. — P. 5556-5563.
47. **Jacobson E.R.** Book Review: Infectious diseases and pathology of reptiles, Color atlas and text. — CRC Press, Boca Raton, 2007.
48. **Jiang Y., Doolittle R.F.** The evolution of vertebrate blood coagulation as viewed from a comparison of puffer fish and sea squirt genomes // *PNAS.* — 2003. — Vol. 100, №13. — P. 7527-7532.
49. **Kaiser P., Rothwell L., Avery S., Balu S.** Evolution of the interleukins // *Dev. Comp. Immunol.* — 2004. — Vol. 28, №5. — P. 375-394.
50. **Kockel L., Homsy J.G., Bohmann D.** Drosophila AP-1: lessons from an invertebrate // *Oncogene.* — 2001. — Vol. 20. — P. 2347-2364.
51. **Kohler H.R., Kloas W., Schirling M.** et al. Sex steroid receptor evolution and signalling in aquatic invertebrates // *Ecotoxicology.* — 2007. — Vol. 16, №1. — P. 131-143.
52. **Koppang E.O., Fischer U., Satoh M., Jirillo E.** Inflammation in fish as seen from a morphological point of view with special reference to the vascular compartment // *Curr. Pharm. Des.* — 2007. — Vol. 13, №36. — P. 3649-3655.
53. **Kruse M., Gamulin V., Cetkovic H., Pancer Z.** et al. Molecular evolution of the metazoan protein kinase C multigene family // *J. Mol. Evol.* — 1996. — Vol. 43, №4. — P. 374-383.
54. **Kultz D.** Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function // *J. Exp. Biol.* — 2003. — Vol. 206. — P. 3119-3124.
55. **Kuroda N., Uinuk-ool T.S., Sato A.** et al. Identification of chemokines and a chemokine receptor in cichlid fish, shark, and lamprey // *Immunogenetics.* — 2003. — Vol. 54. — P. 884-895.

56. **Lacoste A., Malham S.K., Cueff A.** et al. Evidence for a form of adrenergic response to stress in the mollusk // *J. Exp. Biol.* — 2001. — Vol. 204. — P. 1247-1255.
57. **Larroux C., Luke G.N., Koopman P.** et al. Genesis and expansion of metazoan transcription factor gene classes // *Mol. Biol. Evol.* — 2008. — Vol. 25, №5. — P. 980-996.
58. **Legac E., Vaugier G.L., Bousquet F.** et al. Primitive cytokines and cytokine receptors in invertebrates: the sea star *Asterias rubens* as a model of study // *Scand. J. Immunol.* — 1996. — Vol. 44, №4. — P. 375-380.
59. **Lemon M.J., Pack L.A., Forzan M.J.** Valvular endocarditis and septic thrombosis associated with a radial fracture in a red-tailed hawk (*Buteo jamaicensis*) // *Can. Vet. J.* — 2012. — Vol. 53, №1. — P. 79-82.
60. **Leveen P., Larsson J., Ehinger M.** et al. Induced disruption of the transforming growth factor beta type II receptor gene in mice causes a lethal inflammatory disorder that is transplantable // *Blood.* — 2002. — Vol. 100, №2. — P. 560-568.
61. **Loof T.G., Schmidt O., Herwald H., Theopold U.** Coagulation systems of invertebrates and vertebrates and their roles in innate immunity: the same side of two coins? // *J. Innate Immun.* — 2011. — Vol. 3, №1. — P. 34-40.
62. **Malagoli D., Sacchi S., Ottaviani E.** Lectins and cytokines in celomantic invertebrates: two tales with the same end // *ISJ.* — 2010. — Vol. 7. — P. 1-10.
63. **Malagoli D.** Cytokine network in invertebrates: the very next phase of comparative immunology // *ISJ.* — 2010. — Vol. 7. — P. 146-148.
64. **Maloy K.J., Powry F.** Regulatory T cells in the control of immune pathology // *Nat. Immunol.* — 2001. — Vol. 2. — P. 1061-1066.
65. **Mantovani A., Sica A., Sozzani S.** et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization // *Trends Immunol.* — 2004. — Vol. 12. — P. 677-686.
66. **Marais M., Maloney S.K., Gray D.A.** The development of endotoxin tolerance, and the role of hypothalamo-pituitary-adrenal function and glucocorticoids in Pekin ducks // *J. Exp. Biol.* — 2011. — Vol. 214. — P. 3378 — 3385.
67. **Martin L.J.** Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury (Review) // *Int. J. Mol. Med.* — 2001. — Vol. 7, №5. — P. 455-478.
68. **Masuda A., Yoshikai Y., Aiba K., Matsuguchi T.** Th2 cytokine production from mast cells is directly induced by lipopolysaccharide and distinctly regulated by c-Jun N-terminal kinase and p38 pathways // *J. Immunol.* — 2002. — Vol. 169. — P. 3801-3810.
69. **McIlwain B., Timpa J., Kurundkar A.R.** et al. Plasma concentrations of inflammatory cytokines rise rapidly during ECMO-related SIRS due to the release of pre-formed stores in the intestine // *Lab. Invest.* — 2010. — Vol. 90, №1. — P. 128-139.
70. **Mikaelian I., Ouellet M., Pauli B.** et al. Ichthyophonus-like infection in wild amphibians from Quebec, Canada // *Dis. Aquat. Org.* — 2000. — Vol. 40. — P. 195-201.
71. **Montali R.J.** Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals) // *J. Comp. Pathol.* — 1988. — Vol. 99, №1. — P. 1-26.
72. **Mosser D.M.** The many faces of macrophage activation // *J. Leukoc. Biol.* — 2003. — Vol. 73, №2. — P. 209-212.
73. **Mottin S., Montcel B., de Chatellus H.G., Ramstein S.** Functional white-laser imaging to study brain oxygen uncoupling/recoupling in songbirds // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2011. — Vol. 31, №2. — P. 393-400.
74. **Moulin D., Dorze O., Talabot-Ayer D.** et al. Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells // *Cytokine.* — 2007. — Vol. 40, №3. — P. 216-225.
75. **Muleto I., Sepulcre P.M., Meseguer J.** et al. Histamine is stored in mast cells of most evolutionarily advanced fish and regulates the fish inflammatory response // *PNAS* — 2007. — Vol. 104, №49 — P. 19434-19439.
76. **Muller W., Muller I.M.** Origin of the metazoan immune system: identification of the molecules and their functions in sponges // *Integr. Comp. Biol.* — 2003. — Vol. 43, №2. — P. 281-292.
77. **Nair M.G., Guild K.J., Artis D.** Novel effector molecules in type 2 inflammation: Lessons drawn from helminth infection and allergy // *J. Immunol.* — 2006. — Vol. 177, №3. — P. 1393-1399.
78. **Ng P.M.L., Jin Z., Tan S.S.H.** et al. The C-reactive protein: a predominant LPS-binding acute phase protein responsive to *Pseudomonas* infection // *J. Endotoxin Res.* — 2004. — Vol. 10, №3. — P. 163-173.
79. **Nonaka M., Miyazawa S.** Evolution of the initiating enzymes of the complement system // *Genome Biol.* — 2002. — Vol. 3, №1. — P. 1-5.
80. **Nonaka M., Yoshizaki F.** Evolution of the complement system // *Mol. Immunol.* — 2004. — Vol. 40, №12. — P. 897-902.
81. **Nurden A.T.** Platelets, inflammation and tissue regeneration // *Thromb. Haemost.* — 2011. — Vol. 105, №1. — P. 13-33.
82. **Nurieva R.I., Chung Y., Hwang D.** et al. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages // *Immunity.* — 2008. — Vol. 29, №1. — P. 138-149.
83. **Olejnicka B.T., Andersson A., Tyrberg B.** et al. Beta-cells, oxidative stress, lysosomal stability, and apoptotic/necrotic cell death // *Antioxid Redox Signal.* — 1999. — Vol. 3. — P. 305-315.
84. **Otero-Gonzalez A.J., Magalhaes B.S., Garcia-Villarino M.** et al. Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control // *FASEB J.* — 2010. — Vol. 24, №5. — P. 1320-1334.
85. **Ottaviani E., Franchini A., Malagoli D.** Inflammatory response in molluscs: Cross-taxa and evolutionary considerations // *Curr. Pharm. Des.* — 2010. — Vol. 16. — P. 4160-4165.
86. **Pang Y., Xiao R., Liu X., Li Q.** Identification and characterization of the lamprey High-Mobility Group Box 1 gene // *PLoS ONE.* — 2012. — Vol. 7, №4. — e35755.
87. **Papin J.A., Hunter T., Palsson B.O., Subramaniam S.** Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2005. — Vol. 6. — P. 99-111.
88. **Perkins N.D.** Integrating cell-signalling pathways with NF- $\kappa$ B and IKK function // *Mol. Cell Biol.* — 2007. — Vol. 8. — P. 49-62.
89. **Philipp E.E.R., Kraemer L., Melzner F.** et al. Massively parallel RNA sequencing identifies a complex immune gene repertoire in the lophotrochozoan *Mytilus edulis* // *PLoS One.* — 2012. — Vol. 7, №3. — e33091.
90. **Pierrakos C., Vincent J.-L.** Sepsis biomarkers: a review // *Crit. Care.* — 2010. — Vol. 14. — P. 15.
91. **Pozzolini M., Valisano L., Cerrano C.** et al. Influence of rocky substrata on three-dimensional sponge cells model development // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* — 2010. — Vol. 46, №2. — P. 140-147.
92. **Qin L., Wu X., Block M.L.** et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration // *Glia.* — 2007. — Vol. 55, №5. — P. 453-462.
93. **Radtke S., Wuller S., Yang X.** et al. Cross-regulation of cytokine signalling: pro-inflammatory cytokines restrict IL-6 signalling through receptor internalisation and degradation // *J. Cell Sci.* — 2010. — Vol. 123, №6. — P. 947-959.
94. **Rock K.L., Kono H.** The inflammatory response to cell death // *Annu. Rev. Pathol.* — 2008. — Vol. 3. — P. 99-126.
95. **Rosa C.E., Bianchini A., Monserrat J.M.** Antioxidant responses of *Laonereis acuta* (Polychaeta) after exposure to hydrogen peroxide // *Braz. J. Med. Biol. Res.* — 2008. — Vol. 41, №2. — P. 117-121.
96. **Rowle A.F.** The evolution of inflammatory mediators // *Mediators Inflamm.* — 1996. — Vol. 5. — P. 3-13.

97. **Russell M.J., Ryan A.** Effects of hypoxia on vertebrate blood vessels // *J. Exp. Zool.* — 2008. — Vol. 309A, №2. — P. 55-63.
98. **Sailasuta A., Satetasis J., Chutmongkonkul M.** Pathological study of blood parasites in rice field frogs, *Hoplobatrachus rugulosus* // *Vet. Med. Int.* — 2011. — ID 850568.
99. **Sainz I.M., Pixley R.A., Colman R.W.** Fifty years of research on the plasma kallikrein-kinin system: From protein structure and function to cell biology and in-vivo pathophysiology // *Thromb. Haemost.* — 2007. — Vol. 98. — P. 77-83.
100. **Schluter D., Deckert M., Hof H., Frei K.** Toxoplasma gondii infection of neurons induces neuronal cytokine and chemokine production, but Gamma interferon- and Tumor necrosis factor-stimulated neurons fail to inhibit the invasion and growth of *T. gondii* // *Infect. Immun.* — 2001. — Vol. 69, №12. — P. 7889-7893.
101. **Schmaier A.H., McCrae K.R.** The plasma kallikrein-kinin system: its evolution from contact activation // *J. Thromb. Haemost.* — 2007. — Vol. 5, №12. — P. 2323-2329.
102. **Schmaier A.A.** The evolution of platelet responses to collagen under conditions of hemodynamic flow. — Publicly accessible Penn Dissertations, 2010.
103. **Schoofs L., Salzet M.** Trypsin and chymotrypsin inhibitors in insects and gut leeches // *Curr. Pharm. Des.* — 2002. — Vol. 8. — P. 125-133.
104. **Schuler B.T., Qin Z., Ibe S.** T helper cell type 1-associated and cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunity is impaired in interleukin 4-deficient mice // *J. Exp. Med.* — 1999. — Vol. 189, №5. — P. 803-810.
105. **Semple F., Dorin J.R.**  $\beta$ -defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more? // *J. Innate. Immun.* — 2012. — Vol. 4, №4. — P. 337-348.
106. **Seno T., Inoue N., Gao D.** et al. Involvement of NADH/NADPH oxidase in human platelet ROS production // *Thromb. Res.* — 2001. — Vol. 103. — P. 399-409.
107. **Shigei T., Tsuru H., Ishikawa N., Yoshioka K.** Absence of endothelium in invertebrate blood vessels: significance of endothelium and sympathetic nerve/medial smooth muscle in the vertebrate vascular system // *Jpn. J. Pharmacol.* — 2001. — Vol. 87. — P. 253-260.
108. **Shivaprasad H.L.** Pathology of birds — an overview // Presented at C.L. Davis Foundation Conference on Gross Morbid Anatomy of Animals. — AFIP, Washington, 2002.
109. **Simpson J.C., Joggerst B., Laketa V.** et al. Genome-wide RNAi screening identifies human proteins with a regulatory function in the early secretory pathway // *Nat. Cell Biol.* — 2012. — Vol. 14. — P. 764-774.
110. **Smith L.C., Clow L.A., Terwilliger D.P.** The ancestral complement system in sea urchins // *Imm. Rev.* — 2001. — Vol. 180. — P. 16-34.
111. **Sohal R.S., Arnold L., Orr W.C.** Effect of age on superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxidase, TBA-reactive material, GSH/GSSG, NADPH/NADP<sup>+</sup> and NADH/NAD<sup>+</sup> in *Drosophila melanogaster* // *Mech. Ageing Dev.* — 1990. — Vol. 56, №3. — P. 223-235.
112. **Soldati G., Lu Z.H., Vaughan L.** et al. Detection of Mycobacteria and Chlamydiae in granulomatous inflammation of reptiles: a retrospective study // *Vet. Pathol.* — 2004. — Vol. 41. — P. 388-397.
113. **Solomatina L.V., Gusev E.Y., Zhuravleva J.A.** Systemic inflammation as a risk factor of chronic renal allograft dysfunction // *Inflamm. Res.* — 2011. — Vol. 60, №1. — P. 287.
114. **Steinhubl S.R.** Platelets as mediators of inflammation // *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* — 2007. — Vol. 21, №1. — P. 115-121.
115. **Sudheesh P.S., Al-Ghabshi A., Al-Mazrooei N., Al-Habshi S.** Comparative pathogenomics of bacteria causing infectious diseases in fish // *Int. J. Evol. Biol.* — 2012. — ID 457264.
116. **Tangye S.G., Avery D.T., Bryant V.L., Ma C.S.** Follicular CD4<sup>+</sup> T helper cells induce human B cells to undergo Ig isotype switching and differentiation to Ig-secreting cells through the production of IL-21 // *J. Immunol.* — 2007. — Vol. 178, №95. — P. 4051-4061.
117. **The Cytokine Network / Fran Balkwill (Editor).** — USA: Oxford University Press, 2000.
118. **Theoharides T.C., Alysandratos K.D., Angelidou A.** et al. Mast cells and inflammation // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2012. — Vol. 1822, №1. — P. 21-33.
119. **Till G.O., Morganroth M.L., Kunkel R., Ward P.A.** Activation of C5 by cobra venom factor is required in neutrophil-mediated lung injury in the rat // *Am. J. Pathol.* — 1987. — Vol. 129, №1. — P. 44-53.
120. **Trivedi N.N., Caughey G.H.** Mast cell peptidases: chameleons of innate immunity and host defense // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* — 2010. — Vol. 42, №3. — P. 257-267.
121. **Toda H., Saito Y., Koike T.** et al. Conservation of characteristics and functions of CD4 positive lymphocytes in a teleost fish // *Dev. Comp. Immunol.* — 2011. — Vol. 35, №6. — P. 650-660.
122. **Tort L., Balasch J.C., Mackenzie S.** Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses // *Immunologia.* — 2003. — Vol. 22, №3. — P. 277-286.
123. **Tsukamoto K., Kawamura T., Takeuchi T.** et al. Molecular innate immunity in teleost fish: review and future perspectives // *Fisheries for Global Welfare and Environment, 5<sup>th</sup> World Fisheries Congress.* — 2008. — P. 263-276.
124. **Turnbull A.V., Rivier C.L.** Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action // *Physiol. Rev.* — 1999. — Vol. 79, №1. — P. 1-71.
125. **Vogt W.** Complement activation by myeloperoxidase products released from stimulated human polymorphonuclear leukocytes // *Immunobiology.* — 1996. — Vol. 195, №3. — P. 334-346.
126. **Wiens M., Korzhev M., Perovic-Ottstadt S.** et al. Toll-like receptors are part of the innate immune defense system of sponges // *Mol. Biol. Evol.* — 2007. — Vol. 24, №3. — P. 792-804.
127. **Wimmer W., Perovic S., Kruse M.** et al. Origin of the integrin-mediated signal transduction. Functional studies with cell cultures from the sponge *Suberites domuncula* // *Eur. J. Biochem.* — 1999. — Vol. 260, №1. — P. 156-165.
128. **Yaguchi A., Lobo F.L.M., Vincent J.-L., Pradier O.** Platelet function in sepsis. // *J. Thromb. Haemost.* — 2004. — Vol. 2 — P. 2096-2102.
129. **Yanagida M., Fukamachi H., Ohgami K.** et al. Effects of T-helper 2-type cytokines, interleukin-3 (IL-3), IL-4, IL-5, and IL-6 on the survival of cultured human mast cells // *Blood.* — 1995. — Vol. 86. — P. 3705-3714.
130. **Yeama M.R.** Platelets in defense against bacterial pathogens // *Cell Mol. Life Sci.* — 2010. — Vol. 67, №4. — P. 525-544.
131. **Zarbock A., Polanowska-Grabowska R.K., Ley K.** Platelet-neutrophil-interactions: Linking hemostasis and inflammation // *Blood Rev.* — 2007. — Vol. 21. — P. 99-111.

Поступила 12.10.12

## Сведения об авторах:

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

А.В. Родина<sup>1,2</sup>, С.Е. Северин<sup>1,2</sup>

## **Роль адипонектина в патогенезе метаболического синдрома и подходы к терапии**

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный исследовательский центр

«Курчатовский институт» НБИКС-центр,  
123181, Москва, пл. академика Курчатова, 1

<sup>2</sup> Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова,  
119991, Москва, ул. М.Трубецкая, 8

*В обзоре проанализированы данные литературы об одном из ключевых гормонов жировой ткани — адипонектине и определена его роль в патофизиологии и терапии метаболического синдрома (МС). МС характеризуется как комплекс метаболических нарушений, приводящих к развитию сердечно-сосудистых заболеваний. Резистентность к инсулину (ИР) является ключевым фактором в патогенезе МС. Адипонектин — специфический для жировой ткани адипокин. Основным механизмом осуществления метаболических эффектов адипонектина является активация АМФ-зависимых протеинкиназ и рецептора активации пролиферации пероксисом (PPAR $\alpha$ ). Экспрессия рецепторов адипонектина обнаружена на клетках практически всех органов и тканей, что определяет плейотропность его эффектов на физиологические процессы в организме. Инсулин-сенситизирующие, противовоспалительные и антиатерогенные свойства адипонектина лежат в основе его кардиопротекторного действия. Кроме того, адипонектин снижает системную ИР, а также является маркером сердечно-сосудистых патологий. В настоящее время основным направлением современных исследований является повышение концентрации адипонектина в организме путем изменения стиля жизни и/или за счет различных терапевтических агентов, таких, как орлистат, сибутрамин, римонабант, а также инсулин-сенситизирующих препаратов (тиазолидиндионы), гипогликемических средств (статины и фибраты). Приведенные данные свидетельствуют о реальных путях нормализации синтеза адипонектина, что может составить основу для разработки новой стратегии лечения сердечно-сосудистых заболеваний, диабета и МС.*

**Ключевые слова:** адипонектин, жировая ткань, инсулинорезистентность, метаболический синдром

A.V. Rodina<sup>1,2</sup>, S.E. Severin<sup>1,2</sup>

## **The role of adiponectin in the pathogenesis of the metabolic syndrome and approach to therapy**

<sup>1</sup> NBIC Centre, National Research Centre «Kurchatov Institute», Akademika Kurchatova sq., Moscow, 123182, Russia

<sup>2</sup> Sechenov Moscow State Medical University, 8-2, Trubetskaya street, Moscow, 119992, Russia

*In this adiponectin-focused review, the pathophysiological role and the potential therapeutic benefits of adiponectin in metabolic syndrome (MetS) are analysed. MetS is recognized as clusters several metabolic abnormalities and the leading cause of cardiovascular diseases. Insulin resistance (IR) is a key factor in the pathogenesis MetS. Adiponectin is the most abundant and adipose-specific adipokine. Adiponectin acts through the activation of AMP-activated protein kinase and peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) pathways. The wide distribution of adiponectin receptors in various organs and tissues suggests that adiponectin has pleiotropic effects on numerous physiological processes. Its well-known insulin-sensitizing, anti-inflammatory and antiatherosclerotic properties, accumulating evidence suggests that adiponectin may have cardioprotective properties. There is an evidence that adiponectin decreases systematic IR and generally predicts cardiovascular diseases. Recent therapeutic strategies have focused on the indirect upregulation of adiponectin through the administration of various therapeutic agents and/or lifestyle modifications. Weight loss, diet, lifestyle changes and/or medications including orlistat, sibutramine, rimonabant, increase level of adiponectin. Also insulin sensitizers, including thiazolidinediones, and lipid-lowering agents, including statins and fibrates, upregulate adiponectin and may improve IR. The wider use of new treatment approaches appears to signal of a new era in the management of cardiovascular diseases, diabetes mellitus and MetS.*

**Key words:** adiponectin, adipose tissue, insulin resistance, metabolic syndrome

В соответствии с принятой ещё в конце прошлого столетия концепцией, метаболический синдром (МС) представляет собой комплекс этиологических признаков, включающих абдоминальное ожирение, атерогенную дислипидемию, резистентность к инсулину и/или нарушение толерантности к глюкозе, артериальную гипертензию, и дополнительные факторы, не относящиеся к числу обязательных признаков синдрома, такие, как провоспалительный и протромботический статус [66]. Каждый из этих компонентов, как в отдельности, так и в совокупности с другими, вызывает такие осложнения, как сахарный диабет 2-го типа (СД2), а также приводит к развитию и прогрессированию сердечно-сосудистых заболеваний, являющихся основной причиной смертности населения высокоразвитых стран мира. Поэтому поиск и совершенствование патогенетических подходов к коррекции основных компонентов МС на сегодняшний день считаются важнейшими терапевтическими целями в борьбе с его проявлениями и возникновением сопутствующих заболеваний. Однако к настоящему времени не окончательно установленными являются не только механизмы возникновения МС, но и механизмы взаимодействия основных компонентов его структуры и патогенеза, что значительно затрудняет выбор профилактических и лечебных мероприятий.

Несмотря на то, что на сегодняшний день абдоминальное ожирение считается главным образом ответственным за рост распространенности МС, большинство исследователей сходятся во мнении, что все факторы, определяющие развитие метаболического синдрома и его осложнений, имеют общую патогенетическую основу — инсулинорезистентность (ИР) [2, 21, 43, 80]. Поэтому современная стратегия лечения МС и его осложнений в первую очередь направлена на уменьшение выраженности ИР как основы патогенеза заболевания.

Сложность патогенеза МС заключается в том, что по мере прогрессирования ИР клетки мышц перегружаются триглицеридами (ТАГ) из-за высокого уровня свободных жирных кислот в портальной циркуляции, избыточное количество которых также поступает и в печень, что способствует развитию ожирения печени и атерогенной дислипидемии. Резистентность к инсулину в мышцах приводит к нарушению толерантности к глюкозе, которая усугубляется недостаточным подавлением глюконеогенеза в печени в этих условиях. При этом гиперинсулинемия, развивающаяся как компенсаторный механизм для поддержания нормального транспорта глюкозы в клетки в условиях ИР, приводит к повышению выхода ТАГ липопротеинов очень низкой плотности из печени, что увеличивает их уровень в крови. И, наконец, резистентность к инсулину приводит к повышению артериального давления с помощью различных механизмов. В тоже время показано, что резистентность к инсулину обычно возрастает с увеличением содержания жира в организме и большинство людей с установленным ожирением (индекс

массы тела [ИМТ]  $\geq 30$  кг/м<sup>2</sup>) имеют постпрандиальную гиперинсулинемию и ИР [1]. Таким образом, с одной стороны, если причиной ожирения может быть ИР, то с другой стороны, ожирение — причина усиления ИР, и это указывает на то, что последовательность возникновения патологических звеньев МС определяется формированием вторичных причинно-следственных связей в результате взаимного влияния компонентов МС.

После установления эндокринной функции жировой ткани и особой роли секретируемых ею сигнальных молекул в регуляции метаболизма, основным фактором риска развития МС стали считать не просто антропометрическое ожирение, а ожирение с гормональными и воспалительными нарушениями, тесно связанное с ИР [66], поэтому большая часть исследований в этой области сосредоточилась на поиске способов нормализации количества и сигнальных функций жировой ткани в организме.

В результате исследований последних лет выяснилось, что снижение уровня адипонектина — гормона, специфичного для жировой ткани, вызванное генетическими факторами или факторами окружающей среды (например, малоподвижный образ жизни, пища с высоким содержанием жиров), может стать причиной нарушения обмена веществ, и, как следствие, привести к развитию ИР и формированию клинического фенотипа МС [38]. Данные многочисленных экспериментов на животных об обращении таких патологических изменений, как гиперинсулинемия, ИР и ожирение после восстановления экспрессии адипонектина делают этот адипокин возможным кандидатом на роль патогенетического терапевтического средства для коррекции МС [7, 14, 26, 31, 56, 99, 104].

### Особенности структуры и биологические эффекты адипонектина

Впервые гормон жировой ткани адипонектин был выделен и охарактеризован в 1995 г. Р.Е. Scherer с соавторами [84], дальнейшие исследования проводились одновременно несколькими независимыми исследовательскими группами с использованием различных экспериментальных подходов [34, 57, 64]. Было убедительно доказано, что основным источником адипонектина являются адипоциты [34], что этот адипокин относится к суперсемейству коллагена и имеет общую структуру с коллагенами VIII и X, фактором комплемента C1q и фактором некроза опухоли альфа (ФНО- $\alpha$ ) [57]. Адипонектин циркулирует в сыворотке крови в виде нескольких мультимерных форм: от низкомолекулярных комплексов (6 мономеров с молек. массой около 180 кДа) до высокомолекулярных (16—18 мономеров с молек. массой около 400—600 кДа) [64], при этом 1% от общего содержания всего адипонектина плазмы составляют фрагменты его протеолиза, включая C-концевой глобулярный домен [56]. Концентрация циркулирующего адипонектина при физиологической норме поддерживается на очень высо-



ком уровне и составляет от 2 до 30 мкг/мл [24], несмотря на его быструю деградацию в плазме под действием эластаз, секретлируемых моноцитами и/или нейтрофилами [4]. При ожирении концентрация адипонектина снижается пропорционально увеличению доли абдоминального жира [72].

Реализация биологических эффектов адипонектина осуществляется через его специфические рецепторы AdipoR1 и AdipoR2, различающихся как по локализации в тканях, так и по степени аффинности к высокомолекулярным и низкомолекулярным изоформам белка [106]. Экспрессия и AdipoR1, и AdipoR2 обнаружена на клетках мышц, печени и жировой ткани, однако особенно высокий уровень AdipoR1 выявлен в скелетных мышцах, в то время как наибольшее количество AdipoR2 — в печени [106]. Оба вида рецепторов представлены в сердечной ткани [27] и гипоталамусе [15, 50]. Основным механизмом передачи внутриклеточного сигнала от адипонектина является активация АМФ-зависимых протеинкиназ (аденозинмонофосфат-зависимая протеинкиназа, АМФ-К) [107]. АМФ-К являются стресс-зависимыми протеинкиназами, их активация приводит к синтезу АТФ посредством увеличения скорости катаболических процессов, таких как окисление жирных кислот и гликолиз, и снижения скорости АТФ-зависимых процессов биосинтеза, таких, как липогенез. Посредством активации АМФ-К адипонектин нормализует метаболизм в условиях избытка питательных веществ, в том числе и при МС [16]. Помимо АМФ-К, регуляция осуществляется активацией других уникальных наборов сигнальных молекул: фосфотидилинозитол-3-киназы (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3-K), циклооксигеназы-2 (cyclooxygenase-2, COX-2), p44/42 и p38 митоген — активированных протеинкиназ (mitogen-activated protein kinase, MAPK) [38, 42, 87, 88].

Основной физиологической ролью адипонектина является его участие в функционировании гипоталамо-липидарной нейроэндокринной оси и регуляции энергетического гомеостаза. При недостатке энергетических субстратов под действием адипонектина в паравентрикулярном ядре и нейронах аркуатного и латерального ядер гипоталамуса увеличение активности АМФ-К приводит к повышению аппетита [15, 50]. В периферических тканях адипонектин повышает скорость окисления свободных жирных кислот [108]. При избыточном количестве питательных веществ адипонектин sensibilizes клетки к действию инсулина, стимулирует инсулиннезависимый транспорт глюкозы в клетки мышц и жировой ткани, повышает скорость гликолиза, снижая при этом скорость глюконеогенеза в печени, и тем самым предупреждает развитие ИР [16].

Помимо регуляции метаболизма, адипонектин осуществляет множество других биологических функций: стимулирует синтез NO [11] и снижает экспрессию молекул

адгезии в эндотелиальных клетках [68], уменьшает продукцию цитокинов макрофагами [69], усиливает эндотелий-зависимую вазодилатацию [71], индуцирует продукцию антагонистов рецепторов Ил-10 и Ил-1 [100], предотвращает превращение макрофагов в пенистые клетки, снижая экспрессию «скэвенджер»-рецепторов класса А-1 макрофагами [70], понижает способность зрелых макрофагов к фагоцитозу [111], увеличивает экспрессию в макрофагах тканевого ингибитора металлопротеиназ-1 [51], уменьшает пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток [5], снижает экспрессию фактора роста в эндотелиальных клетках [58], ингибирует индуцируемую ФНО- $\alpha$  активацию ядерного фактора NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B) в эндотелиоцитах и гладкомышечных клетках аорты человека [70].

Таким образом, плейотропные эффекты адипонектина (инсулин-сенситизирующие, противовоспалительные и ангиатерогенные) проявляются как в поддержании энергетического гомеостаза, так и в подавлении воспалительных и иммунных реакций организма, играющих важную роль в патогенезе МС и его осложнений.

#### Патогенетическая роль гипoadипонектинемии в развитии и прогрессировании МС и его осложнений

Как уже отмечалось, висцеральное ожирение строго ассоциируется с низким уровнем адипонектина. В организме типы жировых отложений различают в зависимости от их анатомической локализации. В патогенезе МС характер распределения жировых отложений в теле играет даже более важную роль, чем их общее количество. Подкожная и висцеральная жировая ткань имеют различия в функционировании и при физиологической норме, и при патологии. Так, например, экспрессия генов ангиотензиногена, факторов комплемента [29], и белка, связывающего жирные кислоты FABP-4 (fatty acid-binding protein — 4, FABP-4), гораздо выше в висцеральной жировой ткани, чем в подкожной [19]. Лептин в основном продуцируется адипоцитами подкожной жировой ткани, в то время как количество секретлируемого адипоцитами ФНО- $\alpha$  распределяется эквивалентно [25]. Что касается адипонектина, по данным эпидемиологических исследований, у женщин с центральным типом ожирения наблюдается более низкий уровень адипонектина в циркулирующей крови, чем у женщин с периферическим ожирением [93]. В экспериментах *in vitro* показано, что уровень продукции адипонектина адипоцитами, выделенными из сальника, был выше по сравнению с его секретцией клетками, полученными из подкожного жира, и это соотношение уменьшалось с увеличением ИМТ пациентов, у которых был взят биоматериал [62]. И хотя еще окончательно не доказано, исходя из полученных к настоящему времени данных, можно сказать, что в основном висцеральная жировая ткань отвечает за снижение

уровня адипонектина в плазме крови у лиц с ожирением и ИР, и что в этих условиях источником адипонектина является исключительно периферическая жировая ткань. При этом следует отметить, что гипертрофированные в условиях ожирения адипоциты продуцируют гораздо меньше адипонектина по сравнению с нормальными чувствительными к инсулину клетками [36].

Кроме гипoadипонектинемии, обусловленной накоплением жира в висцеральной жировой ткани, имеются данные о существовании генетической гипoadипонектинемии, приводящей к развитию МС. Обнаруженные в промоторном участке гена адипонектина -11391G>A и -11377C>G однонуклеотидные полиморфизмы указывали на низкий уровень адипонектина в крови и определяли риск развития СД 2 [85]. Частота миссенс-мутации 1164T в гене адипонектина среди пациентов с диабетом второго типа была значительно выше, чем у пациентов в контрольной группе с соответствующим возрастом и индексом массы тела и ассоциировалась с более низким уровнем адипонектина в плазме [48]. Кроме того, полиморфизм в генах, кодирующих рецепторы адипонектина, также может увеличивать риск развития резистентности к инсулину и сердечно-сосудистых заболеваний [60].

Данные многочисленных исследований, подтверждающих взаимосвязь между низким уровнем адипонектина и ожирением, ИР, дислипидемией, позволяют рассматривать этот адипокин не только в качестве маркера, но и важнейшего фактора патогенеза МС.

Основной ролью адипонектина в патофизиологии метаболического синдрома является его инсулин-сенситизирующее действие, которое может быть обусловлено активацией различных сигнальных путей.

Исследования по изучению механизмов действия адипонектина на обмен основных энергоносителей в условиях ИР, проводимые *in vitro* и *in vivo* на трансгенных животных с индуцированным ожирением и диабетом позволили выявить некоторые компоненты путей передачи сигнала и ключевые молекулы, контролирующие гомеостаз углеводов и липидов [14, 95, 101, 104—106].

Во-первых, адипонектин улучшает чувствительность тканей к инсулину уменьшая содержание ТАГ. В результате увеличения экспрессии молекул, участвующих в транспорте жирных кислот, в частности, CD36, в их окислении — ацил-коэнзим А-оксидазы и в снижении синтеза АТФ — разобщающего белка UCP 2 (Uncoupling protein 2, UCP 2) под действием адипонектина происходит уменьшение содержания ТАГ в скелетных мышцах [104]. В то время как повышенное содержание ТАГ в тканях препятствует стимуляции инсулином активации PI3-K, транслокации инсулинзависимого транспортера GLUT-4 и поступлению глюкозы в клетки, что в итоге приводит к развитию ИР [63], снижение содержания ТАГ в мышечной ткани под действием адипонектина способствует улучшению трансдукции сигнала от

инсулина. Это было продемонстрировано в экспериментах на мышцах с индуцированным ожирением, у которых введение адипонектина приводило к увеличению индукции инсулином аутофосфорилирования рецептора по остаткам тирозина, усилению метаболических эффектов инсулина, осуществляющихся через субстрат -1 рецептора инсулина IRS-1 (insulin receptor substrate-1, IRS-1) и инсулин-стимулированного фосфорилирования Akt в скелетных мышцах [104].

Во-вторых, адипонектин повышает уровень экспрессии рецептора активации пролиферации пероксисом PPAR $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR $\alpha$ ). Подтверждение этой гипотезы было получено в экспериментах на животных с моногенным ожирением (ob/ob мыши), у которых гиперэкспрессия адипонектина в результате трансфекции аденовирусом приводила к активации через PPAR $\alpha$  экспрессии генов, кодирующих ферменты и транспортные белки, которые контролируют гомеостаз липидов [104]. Дополнительные исследования *in vitro* показали, что инкубация миоцитов мыши линии C2C12 с адипонектином в течение 6 ч приводила к значительному повышению активирующего влияния лигандов PPAR $\alpha$  [106]. Эти данные позволили полагать, что через этот лиганд-активируемый фактор транскрипции осуществляется, по крайней мере, часть инсулин-сенситизирующих эффектов адипонектина, заключающихся в стимуляции скорости окисления жирных кислот и снижении содержания ТАГ в скелетных мышцах и печени, что, в соответствии с вышеизложенным, приводит к улучшению чувствительности тканей к инсулину.

В-третьих, адипонектин нормализует обмен основных энергоносителей в условиях ИР через активацию АМФ-К-зависимого сигнального пути. Данные, полученные на животных показали, что в скелетных мышцах фосфорилирование и активацию АМФ-К стимулируют как глобулярный домен адипонектина, так и полноразмерный белок, а в клетках печени — только полноразмерный адипонектин [105]. Через активацию АМФ-К, адипонектин повышает скорость окисления жирных кислот в результате фосфорилирования и инактивации ацетил-КоА-карбоксилазы, и увеличивает скорость окисления глюкозы и лактата в миоцитах, а также фосфорилирование ацетил-КоА-карбоксилазы и ингибирование глюконеогенеза в печени, что объясняет результаты по эффективному снижению уровня глюкозы в крови под действием адипонектина в условиях *in vivo* [105]. При этом блокирование активности АМФ-К приводит к ингибированию каждого из этих эффектов, что подтверждает тот факт, что стимулирующее действие адипонектина на поглощение глюкозы и окисление жирных кислот происходит в основном за счет активации АМФ-К. Аналогичные результаты были получены исследовательской группой Lodish H.F. и Ruderman N.B., которые показали, что глобулярный домен адипонектина через акти-

вацию АМФ-К и снижение активности ацетил-КоА-карбоксилазы увеличивает скорость транспорта глюкозы и окисления жирных кислот в клетках мышц [95]. Было также продемонстрировано стимулирующее действие глобулярного домена адипонектина на скорость поглощения глюкозы первичными адипоцитами крыс через активацию АМФ-К [101]. В исследованиях научной группы Р.Е. Scherer было обнаружено, что ингибирование синтеза глюкозы в гепатоцитах трансгенных мышей за счет снижения экспрессии mRNA ключевых ферментов глюконеогенеза фосфоенолпируват карбоксикиназы и глюкозо-6-фосфатазы под действием адипонектина также связано с повышением уровня фосфорилированной формы АМФ-К [14]. Стоит отметить, что и в отношении другого адипокина — лептина тоже были получены данные о его способности активировать АМФ-К в клетках скелетных мышц [61]. Сопоставляя экспериментальные данные, можно сделать вывод, что активация АМФ-К является общим механизмом, посредством которого инсулин-сенситизирующие адипокины адипонектин и лептин увеличивают чувствительность к инсулину в условиях ИР, т.е. в данном случае являются синергистами. Однако в связи с этим важно отметить, что, в отличие от адипонектина, проявляющего противовоспалительные и антиатерогенные свойства, в исследованиях *in vitro* и *in vivo* была продемонстрирована способность лептина при взаимодействии со своими специфическими рецепторами на тромбоцитах активировать их, и тем самым способствовать развитию тромбоза артерий [8]. Также выявлена стимуляция образования реактивных форм кислорода в результате активации лептином моноцитов [102]. Таким образом, при ожирении и МС лептин, в отличие от адипонектина, оказывает скорее негативное влияние, так как его инсулин-сенситизирующее действие на мышцы, состояние которых при МС закономерно нарушается, практически не реализуется, но при этом лептин индуцирует секрецию провоспалительных цитокинов, в том числе и жировой тканью, что способствует повреждению сосудов [33].

Физиологическое действие адипонектина в условиях резистентности к инсулину *in vivo* исследовали при введении глобулярного домена адипонектина трансгенным *ob/ob* мышам с ожирением [14, 106] либо мышам *Adipoq*<sup>-/-</sup> (нокаут гена адипонектина) [49, 55, 56]. У *ob/ob* мышей в результате трансфекции глобулярного домена адипонектина аденовирусом происходило частичное обращение ИР и диабета, но не ожирения, и это позволило предположить, что глобулярный домен адипонектина может оказывать инсулин-сенситизирующее действие независимо от массы белой жировой ткани [106]. В исследовании Р.Е. Scherer с соавторами показано, что у трансгенных мышей с делецией гена адипонектина в области коллагеновых доменов наблюдалось 3-кратное повышение уровня циркулирующего адипонектина, повышение

скорости клиренса липидов и активности липопротеинлипазы, а также более эффективное подавление синтеза эндогенной глюкозы, что в итоге приводило к повышению чувствительности к инсулину [14]. У трансгенных крыс устойчивая экспрессия адипонектина предотвращала индуцированное диетой ожирение [91]. Глобулярный адипонектин уменьшал образование атеросклеротических бляшек у мышей без *apoE* (*apoE*-KO), у которых спонтанно развиваются гиперхолестеринемия и тяжелые формы атеросклероза [106]. Важно отметить, что у трансгенных мышей *Adipoq*<sup>-/-</sup> были выражены все компоненты МС, такие, как резистентность к инсулину, нарушение толерантности к глюкозе, гиперлипидемия и гипертензия [49, 56, 71].

В результате исследований последних лет выявлено, что связанная с МС гипoadипонектинемия вносит свой вклад в развитие нефатальных и фатальных сердечно-сосудистых осложнений. В исследованиях *in vivo* показали, что у лишенных адипонектина мышей *Adipoq*<sup>-/-</sup> наблюдался апоптоз кардиомиоцитов и увеличение размеров инфарктов, а также нарушение функций миокарда, что значительно компенсировалось введением как полноразмерного, так и глобулярного адипонектина [88]. Доказано, что протективная роль адипонектина в отношении кардиомиоцитов осуществляется через активацию АМФ-К, так как при блокировании АМФ-К в неонатальных кардиомиоцитах антиапоптотическое действие адипонектина не проявлялось. [88]. Показано, что уменьшение калорийности пищи приводило к повышению устойчивости к повреждениям миокарда, вызываемым ишемией-реперфузией, за счет повышения концентрации адипонектина и активации АМФ-К [90]. Кроме того, в условиях гипоксии/реоксигенации, адипонектин способствовал повышению выживаемости клеток в культуре кардиомиоцитов и снижал индуцированную липополисахаридами экспрессию ФНО- $\alpha$  через активацию COX-2 [89]. Недавнее исследование показало, что увеличение уровня COX-2 в кардиомиоцитах частично происходит и через активацию адипонектином сфингозин-киназы-1 (*sphingosine kinase-1, SK1*) [35]. В экспериментах *in vivo*, у мышей *Adipoq*<sup>-/-</sup> наблюдался низкий уровень экспрессии COX-2, который строго коррелировал с размерами инфаркта и экспрессией ФНО- $\alpha$  [88]. Таким образом, кардиопротекторные свойства адипонектина заключаются в антиапоптотическом действии через активацию АМФ-К-зависимого сигнального пути и в противовоспалительном действии — через активацию COX-2. Кроме того, адипонектин защищает сердечную мышцу от повреждений путем уменьшения окислительного и нитратного стресса миокарда [30].

Обобщая вышеизложенные данные можно заключить, что инсулин-сенситизирующие, кардиопротекторные, противовоспалительные и антиоксидантные свойства адипонектина способны предотвратить основ-

ные нарушения, объединенные рамками МС, поэтому как адипонектин, так и агонисты его рецепторов могут составить основу для разработки новой стратегии лечения МС, СД2 и сердечно-сосудистых заболеваний.

### Терапевтические стратегии лечения МС и его осложнений на основе адипонектина

Для разработки успешной терапевтической стратегии, основанной на повышении уровня адипонектина при его недостаточной продукции в организме, должно быть точно определено каким образом поддерживать этот уровень — путем его прямого введения либо активацией синтеза эндогенного белка с помощью фармакологических препаратов и изменения стиля жизни. Так как уровень адипонектина в плазме крови у здорового человека должен быть очень высоким, поддерживать этот уровень путем прямого введения нативного белка достаточно сложно из-за затруднительного и неоправданно затратного производства больших количеств биологически активного гормона, а также из-за его короткого периода полураспада в циркулирующей крови. Также до настоящего времени не определено, какие формы рекомбинантного адипонектина подходят для использования в качестве терапевтического агента, так как разные формы адипонектина присутствуют в плазме в разных концентрациях и, как уже отмечалось ранее, активируют различные пути трансдукции сигнала в клетках-мишенях. Кроме того, получение биологически активного глобулярного домена, полноразмерного рекомбинантного белка со всеми посттрансляционными модификациями и его олигомерных форм путем экспрессии в бактериях либо в эукариотических клетках является сложной задачей, и возможность их применения в клинической практике на сегодняшний день является предметом дискуссий.

В клинических исследованиях выявлено, что низкокалорийная диета, физическая активность и отказ от алкоголя повышают концентрацию адипонектина в организме [20, 86, 109]. Однако, учитывая тот факт, что фенотип проявлений МС зависит не только от факторов внешней среды, но также и от множества других факторов (в том числе от генетических, гормональных нарушений, от повышенной активности симпатической нервной системы), только изменением стиля жизни даже на фоне снижения массы тела и висцерального жира в том числе не удастся компенсировать нарушения липидного и углеводного обменов, уменьшить ИР и гиперинсулинемию. Поэтому при лечении больных с МС активно применяется медикаментозная терапия, особенно включение в арсенал средств статинов, тиазолидиндионов (ТЗД) и ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (АПФ), которые являются мощными активаторами синтеза эндогенного адипонектина.

Большинство препаратов, которые могут оказывать благотворное влияние на различные патогенети-

ческие компоненты МС за счет активации различных сигнальных механизмов, приводящих к повышению уровня адипонектина, перечислены в таблице.

Механизмы повышения уровня адипонектина под действием различных терапевтических агентов заключаются либо в активации его синтеза в результате индукции или репрессии факторов транскрипции, имеющих сайты связывания в промоторной области гена адипонектина, либо в стимуляции посттрансляционного процессинга (олигомеризация) и секреции белка [75].

Однако использование вышеперечисленных препаратов для коррекции клинических проявлений МС в отдельных случаях требуют большой осторожности при их включении в схему лечения больных из-за возможных побочных эффектов и осложнений сопутствующих заболеваний.

Одной из стратегий терапевтического воздействия при МС является применение лекарств, снижающих вес, что сопровождается уменьшением массы тела, а также массы висцеральной жировой ткани и, соответственно, увеличением уровня адипонектина. Подобная терапия может быть направлена на абсорбционные механизмы, оказывающие влияние на процессы пищеварения и усвоения питательных веществ. Такой механизм лежит в основе действия орлистата [32]. Основным побочным эффектом препарата является стеаторея. При длительном использовании орлистата может возникнуть недостаточность эссенциальных жирных кислот и жирорастворимых витаминов.

У препаратов центрального действия, снижающих аппетит (сIBUTрамин), наиболее значительным побочным действием является возникновение тяжелой легочной гипертензии [76]. У больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями при длительном лечении сIBUTрамином повышался риск развития некротических инфаркта миокарда и инсульта [37].

Римонабант — антагонист каннабиоидных рецепторов, способствующий формированию правильных пищевых стереотипов и ранее успешно применяемый для лечения ожирения, запрещен в Европе из-за возникновения побочных эффектов в результате его воздействия на центральную нервную систему [6, 18].

В случае доминирования нарушений углеводного обмена в виде нарушения толерантности к глюкозе, особенно при СД 2, в схему лечения включают ТЗД [36, 53, 54, 74, 77, 96, 110, 112]. Наиболее характерным побочным действием ТЗД является их негативное влияние на сердечно-сосудистую систему. Другие неблагоприятные эффекты связаны с возникновением печеночной недостаточности, в отдельных случаях применение розиглитазона вызывало острую гепатотоксичность и приводило к летальному исходу [12, 81]. Пиоглитазон обладает более благоприятным токсикологическим профилем по сравнению с росиглитазоном, однако свойства этого препарата изучены недостаточно.

## Повышение концентрации адипонектина в организме за счет различных терапевтических агентов

Группы препаратов	Механизм действия	Метаболический эффект
Статины	В условиях окислительного стресса подавляется транскрипция гена адипонектина через активацию Akt и JAK/STAT-зависимых сигнальных путей [10]. При воспалении ФНО- $\alpha$ осуществляет репрессию гена адипонектина через протеинкиназу С [52] и JNK [44], ИЛ-6 — через p44/42 MAPK [23]. Статины уменьшают окислительный стресс и воспаление за счет снижения выделения активированными макрофагами ФНО- $\alpha$ и ИЛ-6, восстанавливая транскрипцию гена адипонектина. Изучается влияние статинов на посттрансляционные модификации адипонектина, однако механизм окончательно не установлен [98].	Увеличение уровня адипонектина у мужчин с атеросклерозом коронарных артерий при приеме правастатина коррелировало со снижением уровня маркеров окислительного стресса [82]. Прием аторвастатина не влиял на общий уровень адипонектина в крови у больных СД 2, однако было показано увеличение доли его наиболее биологически активных высокомолекулярных форм [98]. Симвастатин и аторвастатин обращали ИР у пациентов с СД 2 [73], однако по другим данным, прием симвастатина либо не влиял, либо усугублял ИР у больных СД 2 [22, 67].
Тиазолидин-дионы (ТЗД)	Механизм действия ТЗД заключается в их способности взаимодействовать с классом ядерных рецепторов PPAR $\gamma$ и, связываясь с чувствительными элементами PPRE (PPAR-responsive element, PPRE) в промоторной области гена адипонектина, стимулировать его экспрессию с последующей транскрипцией. В ТЗД-индуцированной активации гена адипонектина также участвует респонсивный элемент субстрата инсулинового рецептора LRH-1 (liver receptor homolog-1, LRH-1) LRH-RE [36]. ТЗД стимулируют секрецию адипонектина, снижая уровень шаперонов эндоплазматического ретикулума ERp44, способствующих его задержке в клетке [54, 74]. В культуре клеток мышей ТЗД повышают уровни шаперонов Ego1-La, вызывающих освобождение и выход адипонектина, связанного с ERp44 [77]. ТЗД регулируют посттрансляционный процессинг белка, повышая экспрессию шаперонов Ego1-La и DsbA-L, участвующих в формировании мультимерных форм адипонектина [53, 96].	Терапия пиоглитазоном в течение 21 дня приводила к снижению уровня глюкозы и гиперинсулинемии, которое коррелировало с увеличением уровня высокомолекулярных форм адипонектина у пациентов с СД 2 [96]. Росиглитазон повышал уровень адипонектина у больных СД 2 почти в 2 раза. После 6 мес. лечения у пациентов улучшался гликемический статус и снижалась ИР по сравнению с группой, принимавшей плацебо [110]. Троглитазон вызывал повышение уровня адипонектина у больных СД 2 с нормальным весом и с ожирением, значительное снижение уровня глюкозы по сравнению с базовым уровнем через 12 недель лечения, причем оно было одинаковым у больных с наличием ожирения и без. Уровень инсулина после лечения значительно снижался у всех пациентов [112].
Ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) и антагонисты рецептора ангиотензина (АРА)	АРА повышают долю высокомолекулярных форм адипонектина [83]. В культуре клеток телмисартан (АРА) индуцировал транскрипцию мРНК и секрецию адипонектина через активацию PPAR $\gamma$ [103]. Ингибиторы АПФ увеличивают секрецию адипонектина через активацию ретинол-связывающего белка CRBP1 (cellular retinol-binding protein 1, CRBP1), индуцируя экспрессию генов, содержащих респонсивные элементы PPAR, тем самым стимулируя дифференцировку преадипоцитов в зрелые адипоциты [47]. Ингибиторы АПФ повышали экспрессию мРНК рецептора адипонектина в гепатоцитах крыс [113].	Терапия ингибитором АПФ кандесартаном приводила к понижению артериального давления и уровня С-реактивного белка. По сравнению с плацебо, кандесартан значительно снижал уровень инсулина и увеличивал уровень адипонектина в крови [28]. АРА ирбесартан и телмисартан понижали артериальное давление, повышали чувствительность к инсулину в группе больных с ожирением, ИР и гипертонической болезнью. Улучшение метаболических параметров и снижение артериального давления коррелировало с увеличением уровня адипонектина [65].
Фибраты	Фибраты активируют экспрессию класса ядерных рецепторов PPAR $\alpha$ [79], увеличивая количество рецепторов адипонектина на клетках [97].	Терапия фенофибратом приводила к повышению уровня адипонектина, чувствительности к инсулину и значительному понижению уровня маркеров воспаления у больных с гипертриглицеридемией и МС [45, 46].
Селективные $\beta$ -адреноблокаторы	Активация симпатической нервной системы приводит к подавлению синтеза адипонектина. Агонисты $\beta$ -адренорецепторов, через стимуляцию синтеза цАМФ ингибируют экспрессию гена адипонектина и снижают его синтез и секрецию [17]. Ингибируя связывание медиатора симпатической нервной системы с $\beta$ -адренорецепторами, $\beta$ -адреноблокаторы нормализуют синтез адипонектина [9].	Небиволол и метопролол увеличивали уровень адипонектина в плазме крови и повышали чувствительность к инсулину у больных гипертонической болезнью [9].
Бигуаниды	Предполагается, что метформин регулирует посттрансляционный процессинг и секрецию адипонектина [114].	Лечение метформином приводило к увеличению уровня адипонектина и снижению экспрессии маркера воспаления CD68 у пациентов с ожирением [114].
Препараты сульфонил-мочевины	Глимепирид повышает экспрессию гена адипонектина через регуляцию активности протеинкиназы А [40].	После лечения глимепиридом у пациентов с СД 2 значительно повышался уровень липопротеинов высокой плотности [3].

Группы препаратов	Механизм действия	Метаболический эффект
Ресвератрол	Повышает экспрессию мРНК SIRT1 и FoxO1 в адипоцитах, тем самым повышая экспрессию адипонектина [13]. FoxO1, гиперэкспрессия которого индуцируется при активации экспрессии SIRT1 под действием ресвератрола, образуют комплекс с C/EBP $\alpha$ (C/enhancer-binding protein alpha, transcriptional complex, C/EBP $\alpha$ ), и повышают экспрессию мРНК адипонектина [78].	В культуре адипоцитов 3T3-L1 под действием ресвератрола повышалась экспрессия адипонектина и увеличивалась чувствительность к инсулину [41].
Сибутрамин	Селективный ингибитор обратного захвата нейромедиаторов — серотонина и норадреналина, способствующий снижению веса за счет нормализации пищевого поведения [37, 76].	У пациентов с диагностированным ожирением в результате приема сибутрамина снижался вес и повышался уровень адипонектина [37, 76].
Орлистат	Оказывая тормозящее влияние на липазы желудочно-кишечного тракта, препарат препятствует расщеплению и последующему всасыванию пищевых жиров. На фоне применения препарата уменьшается масса висцерально-абдоминального жира и повышается уровень адипонектина [32].	У пациентов с избыточным весом и стеатозом печени при лечении орлистатом (ксеникалом) повышался уровень адипонектина, что коррелировало с улучшением показателей состояния печени [32].
Римонабант	Антагонист каннабиодных рецепторов (cannabinoid receptor subtype 1, CB1-R) римонабант действует непосредственно на адипоциты и увеличивает экспрессию мРНК адипонектина [6].	Лечение римонабантом приводило к снижению веса и улучшению профиля метаболических факторов риска у больных с избыточным весом, ожирением и атерогенной дислипидемией [18].
Спиринолактон	Диуретик спиронолактон (блокатор альдостерона) снижает уровень простагландина 8-iso-PGF2 $\alpha$ и уменьшает окислительный стресс, что приводит к повышению уровня адипонектина [92].	Прием спиронолактона в течение трех месяцев приводил к повышению уровня адипонектина и снижению уровня воспалительных маркеров (ФНО- $\alpha$ , ингибитора активатора плазминогена 1) независимо от изменения артериального давления у больных с СД 2 и диабетической нефропатией [59, 92].

В то же время, учитывая особенности механизма действия тиазолидиндионов, на сегодняшний день их считают перспективной группой средств, заслуживающей дальнейшей разработки и изучения.

Несмотря на эффективность активаторов PPAR $\alpha$  (фенофибрат) в терапии больных с МС, они должны использоваться рационально [9]. Их краткосрочное применение вряд ли приведет к стабильной индукции генов, однако длительное воздействие агонистов PPAR $\alpha$  на клетки приводило к окислительным повреждениям ДНК [94].

Учитывая тот факт, что при ожирении и ИР уменьшается не только уровень адипонектина, но и количество его рецепторов, эффективным терапевтическим подходом может быть использование комбинации препаратов, активирующих оба класса ядерных рецепторов: индукция тиазолидиндионами PPAR $\gamma$  будет приводить к увеличению уровня циркулирующего гормона, а активация PPAR $\alpha$  — к повышению количества рецепторов адипонектина.

Несмотря на разработку новых классов гипогликемических средств, производные сульфонилмочевины [3, 40] и бигуаниды [114] являются на сегодняшний день наименее токсичными и более безопасными.

Гипотензивная терапия при МС является патогенетической, и влияет не только на показатели артериаль-

ного давления, но и на углеводный и липидный обмен, в том числе за счет повышения уровня адипонектина. Более предпочтительными в настоящее время являются ингибиторы АПФ [28, 47, 113], АПА [65, 83, 103] и селективные  $\beta$ -блокаторы [9, 17], так как применение диуретиков [59, 92] в высоких дозах может привести к повышению уровня ТАГ, общего холестерина и холестерина липопротеинов низкой плотности.

Антиоксидант ресвератрол [14, 41, 78] в высоких дозах способствует повышению чувствительности клеток к действию инсулина, но при этом обладает сильными окислительными свойствами, и в настоящее время ведутся эксперименты по разработке фармацевтических форм этого препарата для клинического применения в терапии СД 2.

Таким образом, можно предположить, что разработка новых препаратов, которые могут оказывать благотворное влияние на различные патогенетические компоненты МС за счет повышения уровня адипонектина, и их комбинаций с уже включенными в схемы лечения больных, может быть перспективным направлением в лечении заболеваний, связанных с нарушением чувствительности тканей к инсулину, причем выбор тактики ведения таких больных должен быть индивидуальным в зависимости от наличия или отсутствия сопутствующих патологий.

### Заключение

Учитывая уникальные свойства адипонектина, перспективной целью в профилактике и лечении заболеваний, связанных с ожирением и ИР, является повышение его концентрации у лиц с факторами риска. Дальнейшие исследования, направленные на изучение роли адипонектина в патогенезе МС, и реализация перечисленных выше терапевтических подходов, а также поиск новых фармакологических препаратов, способствующих повышению уровня этого гормона, может существенно повлиять на качество жизни больных с МС и предотвратить возникновение опасных для жизни осложнений.

### Список литературы

1. *Abbasi F., Brown B.W., Lamendola C.* et al. Relationship between obesity, insulin resistance, and coronary heart disease risk // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2002. — 40. — P. 937-943.
2. *Abdul-Ghani M.A., DeFronzo R.A.* Mitochondrial dysfunction, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus // *Curr. Diab. Rep.* — 2008. — 8(3). — P. 173-178.
3. *Araki T., Emoto M., Konishi T.* et al. Glimperide increases high-density lipoprotein cholesterol via increasing adiponectin levels in type 2 diabetes mellitus // *Metabolism.* — 2009. — 58. — P. 143-148.
4. *Arita Y., Kihara S., Ouchi N.* et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1999. — 257. — P. 79-83.
5. *Arita Y., Kihara S., Ouchi N.* et al. Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell // *Circulation.* — 2002. — 105. — P. 2893-2898.
6. *Bensaid M., Gary-Bobo M., Esclançon A.* et al. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells // *Mol. Pharmacol.* — 2003. — 63. — P. 908-914.
7. *Berg A.H., Combs T.P., Du X.* et al. The adipocyte-secreted protein Acp30 enhances hepatic insulin action // *Nat. Med.* — 2001. — 7. — P. 947-953.
8. *Bodary P.F., Westrick R.J., Wickenheiser K.J.* et al. Effect of leptin on arterial thrombosis following vascular injury in mice // *J. Am. Med. Assn.* — 2002. — 287. — P. 1706-1709.
9. *Celik T., Iyisoy A., Kursaklioglu H.* et al. Comparative effects of nebivolol and metoprolol on oxidative stress, insulin resistance, plasma adiponectin and soluble P-selectin levels in hypertensive patients // *J. Hypertens.* — 2006. — 24. — P. 591-596.
10. *Chen B., Wei J., Wang W.* et al. Identification of signaling pathways involved in aberrant production of adipokines in adipocytes undergoing oxidative stress // *Arch. Med. Res.* — 2009. — 40. — P. 241-248.
11. *Chen H., Montagnani M., Funahashi T.* et al. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells // *J. Biol. Chem.* — 2003. — 278. — P. 45021-45026.
12. *Chojkier M.* Troglitazone and liver injury: in search of answers // *Hepatology.* — 2005. — 41. — P. 237-246.
13. *Costa Cdos S., Rohden F., Hammes T.O.* et al. Resveratrol Upregulated SIRT1, FOXO1, and Adiponectin and Downregulated PPAR $\gamma$ 1-3 mRNA Expression in Human Visceral Adipocytes // *Obes. Surg.* — 2011. — 21. — P. 356-361.
14. *Combs T.P., Pajvani U.B., Berg A.H.* et al. A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity // *Endocrinology.* — 2004. — 145. — P. 367-383.
15. *Coope A., Milanski M., Araujo E.P.* et al. AdipoR1 mediates the anorexigenic and insulin/leptinlike actions of adiponectin in the hypothalamus // *FEBS Lett.* — 2008. — 582. — P. 1471-1476.
16. *Deepta S.S., Dong L.Q.* APPL1: role in adiponectin signaling and beyond // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* — 2009. — 296. — E22-E36.
17. *Delporte M.L., Funahashi T., Takahashi M.* et al. Pre- and post-translational negative effect of beta-adrenoreceptor agonists on adiponectin secretion: in vitro and in vivo studies // *Biochem. J.* — 2002. — 367. — P. 677-685.
18. *Despres J.P., Golay A., Sjostrom L.* Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia // *N. Engl. J. Med.* — 2005. — 353. — P. 2121-2134.
19. *Dusserre E., Moulin P., Vidal H.* Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues // *Bioclim. Biophys. Acta.* — 2000. — 1500. — P. 88-96.
20. *Esposito K., Pontillo A., Di Palo C.* et al. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial // *JAMA.* — 2003. — 289. — P. 1799-1804.
21. *Ferrannini E.* Is insulin resistance the cause of the metabolic syndrome? // *Ann. Med.* — 2006. — 38(1). — P. 42-51.
22. *Farrer M., Winocour P.H., Evans K.* et al. Simvastatin in non-insulindependent diabetes mellitus: effect on serum lipids, lipoproteins and haemostatic measures // *Diabetes Res. Clin. Pract.* — 1994. — 23. — P. 111-119.
23. *Fasshauer M., Kralisch S., Klier M.* et al. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2003. — 301. — P. 1045-1050.
24. *Fonseca-Alaniz M.H., Takada J., Alonso M.I., Lima F.B.* Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice // *J. Pediatrics.* — 2007. — 83(5). — P. S192-S203.
25. *Fontana L., Eagon J.C., Trujillo M.E.* et al. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans // *Diabetes.* — 2007. — 56. — P. 1010-1013.
26. *Fruebis J., Tsao T.S., Javorschi S.* et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2001. — 98. — P. 2005-2010.
27. *Fujioka D., Kawabata K., Saito Y.* et al. Role of adiponectin receptors in endothelin-induced cellular hypertrophy in cultured cardiomyocytes and their expression in infarcted heart // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2006. — 290. — H2409-H2416.
28. *Furuhashi M., Ura N., Higashiura K.* et al. Blockade of the renin-angiotensin system increases adiponectin concentrations in patients with essential hypertension // *Hypertension.* — 2003. — 42. — P. 76-81.
29. *Gabrielsson B.G., Johansson J.M., Loenn M.* et al. High expression of complement components in omental adipose tissue in obese men // *Obes. Res.* — 2003. — 11. — P. 699-1708.

30. **Goldstein B.J., Scalia R.G., Ma X.L.** Protective vascular and myocardial effects of adiponectin // *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* — 2009. — 6. — P. 27-35.
31. **Han S.H., Quon M.J., Kim J.A., Koh K.K.** Adiponectin and cardiovascular disease: response to therapeutic interventions // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2007. — 49. — P. 531-538.
32. **Harrison S.A., Fecht W., Brunt E.M., Neuschwander-Tetri B.A.** Orlistat for overweight subjects with nonalcoholic steatohepatitis: A randomized, prospective trial // *Hepatology*. — 2009. — 49(1). — P. 80-86.
33. **Harwood H.J. Jr.** The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis // *Neuropharmacology*. — 2012. — 63(1). — P. 57-75.
34. **Hu E., Liang P., Spiegelman B.M.** AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity // *J. Biol. Chem.* — 1996. — 271. — P. 10697-10703.
35. **Ikeda Y., Ohashi K., Shibata R.** et al. Cyclooxygenase-2 induction by adiponectin is regulated by a sphingosine kinase-1 dependent mechanism in cardiac myocytes // *FEBS Lett.* — 2008. — 582. — P. 1147-1150.
36. **Iwaki M., Matsuda M., Maeda N.** et al. Induction of adiponectin, a fat derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors // *Diabetes*. — 2003. — 52. — P. 1655-1663.
37. **James W.P., Caterson I.D., Coutinho W.** et al. Effect of sibutramine on cardiovascular outcomes in overweight and obese subjects // *N. Engl. J. Med.* — 2010. — 363. — P. 905-917.
38. **Kadowaki T., Yamauchi T.** Adiponectin and adiponectin receptors // *Endocr. Rev.* — 2005. — 26. — P. 439-451.
39. **Kadowaki T., Yamauchi T., Kubota N.** et al. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome // *J. Clin. Invest.* — 2006. — 116(7). — P. 1784-1792.
40. **Kanda Y., Matsuda M., Tawaramoto K.** et al. Effects of sulfonylurea drugs on adiponectin production from 3T3-L1 adipocytes: implication of different mechanism from pioglitazone // *Diabetes Res. Clin. Pract.* — 2008. — 81. — P. 13-18.
41. **Kang L., Heng W., Yuan A.** et al. Resveratrol modulates adipokine expression and improves insulin sensitivity in adipocytes: Relative to inhibition of inflammatory responses // *Biochimie*. — 2010. — 92. — P. 789-796.
42. **Karmazyn M., Purdham D.M., Rajapurohitam V., Zeidan A.** Signalling mechanisms underlying the metabolic and other effects of adipokines on the heart // *Cardiovasc. Res.* — 2008. — 79. — P. 279-286.
43. **Kim J., Montagnani M., Koh K.K., Quon M.J.** Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction. Molecular and pathophysiological mechanisms // *Circulation*. — 2006. — 113. — P. 1888-1904.
44. **Kim K.Y., Kim J.K., Jeon J.H.** et al. c-Jun N-terminal kinase is involved in the suppression of adiponectin expression by TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2005. — 327. — P. 460-467.
45. **Koh K.K., Han S.H., Quon M.J.** et al. Beneficial effects of fenofibrate to improve endothelial dysfunction and raise adiponectin levels in patients with primary hypertriglyceridemia // *Diabetes Care*. — 2005. — 28(6). — P. 1419-1424.
46. **Koh K.K., Quon M.J., Han S.H.** et al. Additive beneficial effects of fenofibrate combined with candesartan in the treatment of hypertriglyceridemic hypertensive patients // *Diabetes Care*. — 2006. — 29. — P. 195-201.
47. **Kohlstedt K., Gershome C., Trouvain C.** et al. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors modulate cellular retinol-binding protein 1 and adiponectin expression in adipocytes via the ACE-dependent signaling cascade // *Mol. Pharmacol.* — 2009. — 75. — P. 685-692.
48. **Kondo H., Shimomura I., Matsukawa Y.** et al. Association of adiponectin mutation with type 2 diabetes: a candidate gene for the insulin resistance syndrome // *Diabetes*. — 2002. — 51(7). — P. 2325-2328.
49. **Kubota N., Terauchi Y., Yamauchi T.** et al. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation // *J. Biol. Chem.* — 2002. — 277. — P. 25863-25866.
50. **Kubota N., Yano W., Kubota T.** et al. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake // *Cell. Metab.* — 2007. — 6. — P. 55-68.
51. **Kumada M., Kihara S., Ouchi N.** et al. Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages // *Circulation*. — 2004. — 109. — P. 2046-2049.
52. **Lim J.Y., Kim W.H., Park S.I.** GO6976 prevents TNF-alpha-induced suppression of adiponectin expression in 3T3-L1 adipocytes: putative involvement of protein kinase C // *FEBS Lett.* — 2008. — 582. — P. 3473-3478.
53. **Liu M., Zhou L., Xu A.** et al. A disulfide-bond A oxidoreductase-like protein (DsbA-L) regulates adiponectin multimerization // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2008. — 105. — P. 18302-18307.
54. **Long Q., Lei T., Feng B.** et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma increases adiponectin secretion via transcriptional repression of endoplasmic reticulum chaperone protein ERp44 // *Endocrinology*. — 2010. — 151. — P. 3195-3203.
55. **Ma K., Cabrero A., Saha P.K.** et al. Increased  $\alpha$ -oxidation but no insulin resistance or glucose intolerance in mice lacking adiponectin // *J. Biol. Chem.* — 2002. — 277. — P. 34658-34661.
56. **Maeda N., Shimomura I., Kishida K.** et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30 // *Nat. Med.* — 2002. — 8(7). — P. 731-737.
57. **Maeda K., Okubo K., Shimomura I.** et al. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant gene transcript 1) // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1996. — 221. — P. 286-289.
58. **Matsuda M., Shimomura I., Sata M.** et al. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis: the missing link of adipo-vascular axis // *J. Biol. Chem.* — 2002. — 277. — P. 37487-37491.
59. **Matsumoto S., Takebayashi K., Aso Y.** The effect of spirinolactone on circulating adipocytokines in patients with type 2 diabetes mellitus complicated by diabetic nephropathy. *Metabolism*. — 2006. — 55(12). — P. 1645-1652.
60. **Menzaghi C., Trischitta V., Doria A.** Genetic influences of adiponectin on insulin resistance, type 2 diabetes, and cardiovascular disease // *Diabetes*. — 2007. — 56. — P. 1198-1209.
61. **Minokoshi Y., Kim Y.B., Peroni O.D.** et al. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase // *Nature*. — 2002. — 415. — P. 339-343.
62. **Motoshima H., Wu X., Sinha M.K.** et al. Differential regulation of adiponectin secretion from cultured human omental and subcutaneous adipocytes: effects of insulin and rosiglitazone // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2002. — 87. — P. 5662-5667.
63. **Muntoni S., Muntoni S.** Insulin resistance: pathophysiology and rationale for treatment // *Ann. Nutr. Metab.* — 2011. — 58. — P. 25-36.
64. **Nakano Y., Tobe T., Choi-Miura** et al. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma // *J. Biochem. Tokyo*. — 1996. — 120. — P. 803-812.
65. **Negro R., Formoso G., Hassan H.** The effects of irbesartan and telmisartan on metabolic parameters and blood pressure in obese, insulin resistant, hypertensive patients // *J. Endocrinol. Invest.* — 2006. — 29. — P. 957-961.



66. **Oda E.** Metabolic syndrome: its history, mechanisms, and limitations // *Acta Diabetol.* — 2012. — 49(2). — P. 89-95.
67. **Ohrvall M., Lithell H., Johansson J., Vessby B.** A comparison between the effects of gemfibrozil and simvastatin on insulin sensitivity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and hyperlipoproteinemia // *Metabolism.* — 1995. — 44. — P. 212-217.
68. **Ouchi N., Kihara S., Arita Y.** et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein // *Circulation.* — 1999. — 100. — P. 2473-2476.
69. **Ouchi N., Kihara S., Arita Y.** et al. Adiponectin, adipocyte-derived protein, inhibits endothelial NF- $\kappa$ B signaling through cAMP-dependent pathway // *Circulation.* — 2000. — 102. — P. 1296-1301.
70. **Ouchi N., Kihara S., Arita Y.** et al. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages // *Circulation.* — 2001. — 103. — P. 1057-1063.
71. **Ouchi N., Ohishi M., Kihara S.** et al. Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity // *Hypertension.* — 2003. — 42. — P. 231-234.
72. **Pajvani U.B., Du X., Combs T.P.** et al. Structure-function studies of the adipocytokine hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity // *J. Biol. Chem.* — 2003. — 278. — P. 9073-9085.
73. **Paolisso G., Barbagallo M., Petrella G.** et al. Effects of simvastatin and atorvastatin administration on insulin resistance and respiratory quotient in aged dyslipidemic non-insulin dependent diabetic patients // *Atherosclerosis.* — 2000. — 150. — P. 121-127.
74. **Phillips S.A., Kung J., Ciaraldi T.P.** et al. Selective regulation of cellular and secreted multimeric adiponectin by antidiabetic therapies in humans // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* — 2009. — 297. — P. E767-773.
75. **Phillips S.A., Kung J.T.** Mechanisms of adiponectin regulation and use as a pharmacological target // *Current Opinion in Pharmacology.* — 2010. — 10. — P. 676-683.
76. **Polyzos S.A., Kountouras J., Zavos C., Tsiaousi E.** The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease // *Diabetes Obes. Metab.* — 2010. — 12. — P. 365-383.
77. **Qiang L., Wang H., Farmer S.R.** Adiponectin secretion is regulated by SIRT1 and the endoplasmic reticulum oxidoreductase Ero1-L alpha // *Mol. Cell. Biol.* — 2007. — 27. — P. 4698-4707.
78. **Qiao L., Shao J.** SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/EBP $\alpha$  enhancer-binding protein alpha transcriptional complex // *J. Biol. Chem.* — 2006. — 281. — P. 39915-39924.
79. **Rahman S.M., Qadri I., Janssen R.C., Friedman J.E.** Fenofibrate and PBA prevent fatty acid-induced loss of adiponectin receptor and pAMPK in human hepatoma cells and in hepatitis C virus-induced steatosis // *J. Lipid. Res.* — 2009. — 50. — P. 2193-2202.
80. **Reaven G.M.** The metabolic syndrome: is this diagnosis necessary? // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2009. — 83. — P. 1237-1247.
81. **Reynaert H., Geerts A., Henrion J.** Review article: the treatment of non-alcoholic steatohepatitis with thiazolidinediones // *Aliment Pharmacol. Ther.* — 2005. — 22. — P. 897-905.
82. **Saito S., Fujiwara T., Matsunaga T.** et al. Increased adiponectin synthesis in the visceral adipose tissue in men with coronary artery disease treated with pravastatin: a role of the attenuation of oxidative stress // *Atherosclerosis.* — 2008. — 199. — P. 378-383.
83. **Satoh M., Tabuchi T., Minami Y.** et al. Prospective, randomized, single-blind comparison of effects of 6 months of treatment with telmisartan versus enalapril on high-molecular-weight adiponectin concentrations in patients with coronary artery disease // *Clin. Ther.* — 2009. — 31. — P. 2113-2125.
84. **Scherer P.E., Williams S., Fogliano** et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes // *J. Biol. Chem.* — 1995. — 270. — P. 26746-26749.
85. **Schwarz P.E., Towers G.W., Fischer S.** et al. Hypoadiponectinemia is associated with progression toward type 2 diabetes and genetic variation in the ADIPOQ gene promoter // *Diabetes Care.* — 2006. — 29(7). — P. 1645-1650.
86. **Shai I., Rimm E.B., Schulze M.B.** et al. Moderate alcohol intake and markers of inflammation and endothelial dysfunction among diabetic men // *Diabetologia.* — 2004. — 47. — P. 1760-1767.
87. **Shibata R., Ouchi N., Ito M.** et al. Adiponectin mediated modulation of hypertrophic signals in the heart // *Nat. Med.* — 2004. — 10. — P. 1384-1389.
88. **Shibata R., Sato K., Pimentel** et al. Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms // *Nat. Med.* — 2005. — 11. — P. 1096-1103.
89. **Shibata R., Skurk C., Ouchi N.** et al. Adiponectin promotes endothelial progenitor cell number and function // *FEBS Lett.* — 2008. — 582. — P. 1607-1612.
90. **Shinmura K., Tamaki K., Saito K.** et al. Cardioprotective effects of short-term caloric restriction are mediated by adiponectin via activation of AMP-activated protein kinase // *Circulation.* — 2007. — 116. — P. 2809-2817.
91. **Shklyavets S., Aslanidi G., Tennant M.** et al. Sustained peripheral expression of transgene adiponectin offsets the development of diet-induced obesity in rats // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2003. — 100. — P. 14217-14222.
92. **Takebayashi K., Matsumoto S., Aso Y., Inukai T.** Aldosterone blockade attenuates urinary monocyte chemoattractant protein-1 and oxidative stress in patients with type 2 diabetes complicated by diabetic nephropathy // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2006. — 91(6). — P. 2214-2217.
93. **Tanko L.B., Bruun J.M., Alexandersen P.** et al. Novel associations between bioavailable estradiol and adipokines in elderly women with different phenotypes of obesity: implications for atherogenesis // *Circulation.* — 2004. — 110. — P. 2246-2252.
94. **Teoh N.C., Williams J., Hartley J.** et al. Short-term therapy with peroxisome proliferation-activator receptor-alpha agonist Wy-14,643 protects murine fatty liver against ischemia-reperfusion injury // *Hepatology.* — 2010. — 51. — P. 996-1006.
95. **Tomas E., Tsao T.S., Saha A.K.** et al. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2002. — 99. — P. 16309-16313.
96. **Tonelli J., Li W., Kishore P.** et al. Mechanisms of early insulinsensitizing effects of thiazolidinediones in type 2 diabetes // *Diabetes.* — 2004. — 53. — P. 1621-1629.
97. **Tsuchida A., Yamauchi T., Takekawa S.** et al. Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) alpha activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: comparison of activation of PPARalpha, PPARgamma, and their combination // *Diabetes.* — 2005. — 54(12). — P. 3358-3370.
98. **von Eynatten M., Liu D., Bluemmel A.** et al. Changes in adiponectin multimer distribution in response to atorvastatin treatment in patients with type 2 diabetes // *Clin. Endocrinol. (Oxf.).* — 2009. — 71. — P. 27-32.

99. *Weyer C., Funahashi T., Tanaka S.* et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2001. — 86. — P. 1930-1935.
100. *Wolf A.M., Wolf D., Rumpold H.* et al. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2004. — 323. — P. 630-635.
101. *Wu X., Motoshima H., Mahadev K.* et al. Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes // *Diabetes.* — 2004. — 52. — P. 1355-1363.
102. *Xu F.P., Chen M.S., Wang Y.Z.* et al. Leptin induces hypertrophy via endothelin-1-reactive oxygen species pathway in cultured neonatal rat cardiomyocytes // *Circulation.* — 2004. — 110. — P. 1269-1275.
103. *Yamada S., Ano N., Toda K.* et al. Telmisartan but not candesartan affects adiponectin expression in vivo and in vitro // *Hypertens. Res.* — 2008. — 31. — P. 601-606.
104. *Yamauchi T., Kamon J., Waki H.* et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity // *Nat. Med.* — 2001. — 7. — P. 941-946.
105. *Yamauchi T., Kamon J., Minokoshi Y.* et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase // *Nat. Med.* — 2002. — 8. — P. 1288-1295.
106. *Yamauchi T., Kamon J., Waki H.* et al. Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and apoE-deficient mice from atherosclerosis // *J. Biol. Chem.* — 2003. — 278. — P. 2461-2468.
107. *Yamauchi T., Kamon J., Ito Y.* et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects // *Nature.* — 2003. — 423. — P. 762-769.
108. *Yamauchi T., Kadowaki T.* Physiological and pathophysiological roles of adiponectin and adiponectin receptors in the integrated regulation of metabolic and cardiovascular diseases // *International Journal of Obesity.* — 2008. — 32. — S13-S18.
109. *Yang W.S., Lee W.J., Funahashi T.* et al. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2001. — 86. — P. 3815-3819.
110. *Yang W.S., Jeng C.Y., Wu T.J.* et al. Synthetic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, rosiglitazone, increases plasma levels of adiponectin in type 2 diabetic patients // *Diabetes Care.* — 2002. — 25. — P. 376-380.
111. *Yokota T., Oritani K., Takahashi I.* et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages // *Blood.* — 2000. — 96. — P. 1723-1732.
112. *Yu J.G., Javorschi S., Hevener A.L.* et al. The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects // *Diabetes.* — 2002. — 51. — P. 2968-2974.
113. *Zhang X., Li Z.Z., Liu D.F.* et al. Angiotensin converting enzyme inhibitors improve hepatic steatosis by modulating expression of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6 and adiponectin receptor-2 in rats with type 2 diabetes // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* — 2009. — 36. — P. 631-636.
114. *Zulian A., Canello R., Girola A.* et al. In vitro and in vivo effects of metformin on human adipose tissue adiponectin // *Obes. Facts.* — 2011. — 4(1). — P. 27-33.

Поступила 28.09.12

### Сведения об авторах:

Северин Сергей Евгеньевич, член-корр. РАН, нач. отд. молекулярной биологии НИЦ «Курчатовский институт» НБИКС-центр, зав. каф. биохимии лечебного факультета, ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова.

© Коллектив авторов, 2013  
УДК 615+616.89:571.27

В.В. Колобов<sup>1</sup>, В.Г. Фомина<sup>2</sup>, В.Ю. Горбатов<sup>2</sup>, Т.В. Давыдова<sup>2</sup>

## Сравнение эффектов антител к глутамату на нейрональную активность каспазы-3 и нарушения памяти у крыс, вызванные введением $A\beta_{25-35}$ в ядра Мейнерта

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр неврологии» Российской академии медицинских наук, 125367, Москва, Волоколамское ш., 80

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

В экспериментах на крысах показано, что интраназальное введение антител к глутамату в дозе 300 мкг/кг спустя 1 ч после билатеральной инъекции в ядра Мейнерта нейротоксического фрагмента  $\beta$ -амилоидного белка (25-35) —  $A\beta_{25-35}$  — препятствует развитию нарушений памяти на 3 и 14 сутки наблюдения, выявленные в тесте условного рефлекса пассивного избегания. Антитела к глутамату снижают повышенную активность каспазы-3, выявляемую на 3 сутки после введения  $A\beta_{25-35}$  в образцах префронтальной коры и гиппокампа, но не гипоталамуса. Интраназальное введение  $\gamma$ -глобулина не оказывало влияния на нарушение памяти и активность каспазы-3.

**Ключевые слова:** антитела к глутамату, экспериментальная болезнь Альцгеймера, условный рефлекс пассивного избегания, активность каспазы-3

V.V. Kolobov<sup>1</sup>, V.G. Fomina<sup>2</sup>, V.Yu. Gorbatov<sup>2</sup>, T.V. Davydova<sup>2</sup>

## Comparison of the effects of glutamate antibodies on neuronal activity of caspase 3 and memory impairment in rats induced by injection of $A\beta_{25-35}$ into the Meynert nuclei

<sup>1</sup> Research Center of Neurology RAMS, 80, Volokolamskoye hwy., Moscow, 125367, Russia

<sup>2</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

In experiments on rats showed that intranasal administration of glutamate antibodies in a dose of 300  $\mu$ g/kg after 1 h after bilateral injection of neurotoxic fragment of  $\beta$ -amyloid protein (25-35) —  $A\beta_{25-35}$  — into the Meynert nuclei restores learning ability in the test of passive avoidance on 3 and 14 days of the experiment. Antibodies to glutamate decrease significantly increasing caspase 3 activity, detected on Day 3 after injection of  $A\beta_{25-35}$ , in samples of the prefrontal cortex and hippocampus but not hypothalamus. Intranasal administration of  $\gamma$ -globulin had no effect on the performance of violations of mnemonic functions and caspase 3 activity.

**Key words:** antibodies to glutamate, experimental Alzheimer's disease, passive avoidance, caspase 3 activity

При болезни Альцгеймера (БА), являющейся наиболее частой причиной деменций у людей пожилого возраста, в сыворотке крови обнаруживаются аутоантитела к глутамату, причем в группе пациентов с поздним началом БА концентрация аутоантител к глутамату в 1,5 раза выше, чем в группе пациентов с ранним началом заболевания [2]. Антитела к глутамату (АТ-Глу) привлекают особое внимание при хронических нейродегенеративных повреждениях мозга, в патогенезе которых глутамат играет важную роль [1].

Сенильные бляшки, являющиеся морфологическим исходом накопления агрегированного бета-амилоидного белка ( $A\beta$ ) в тканях головного мозга пациентов с БА, богаты расщепленным каспазой-3 предшественником  $A\beta$  [12]. Получены свидетельства, что увеличение активности каспазы-3 способствует гибели нейронов и формированию сенильных бляшек при БА [18]. При экспериментальной БА в условиях *in vitro* и *in vivo* документирована повышенная экспрессия и активация каспаз [12].

Для изучения механизмов развития БА используется фармакологическая модель, в ходе которой животным вводят состоящий из 11 аминокислотных остатков GSNKGAIGLM нейротоксический фрагмент бета-амиоида (25-35) —  $A\beta_{25-35}$ . Указанный

Для корреспонденции: Колобов Виталий Викторович, асп. ФГБУ «ННЦ» РАМН. E-mail: f.neurochemistry@gmail.com

пептид инициирует усиление глутаматной эксайтотоксичности [13], вызывая нарушение гомеостаза ионов кальция, усиление окислительного стресса, ведущих к энергетическому истощению нервных клеток и развитию их апоптотической гибели [11].

Целью настоящей работы было изучение влияния интраназального введения АТ-Глу на нарушения памяти и активность каспазы-3 в структурах головного мозга крыс на 3 и 14 сутки после введения  $A\beta_{25-35}$  в базальные ядра Мейнерта.

### Методика

Опыты были проведены на 120 крысах-самцах Wistar (280—310 г), выращенных в виварии ФГБУ «НИИОПП» РАН. Животных содержали в стандартных условиях при свободном доступе к пище и воде и 12-часовом световом режиме. Содержание и экспериментальные процедуры проводили в соответствии с правилами Совета Европейского сообщества (Директива 2010/63/EU от 22.09.2010 г.).

На каждую временную точку (третьи и 14-е сутки) параллельно проведено 2 серии экспериментов: биохимическая и поведенческая. В каждой серии крысы были разделены на 5 групп (по 6 животных в каждой):

- 1 — интактные (И);
- 2 — ложнопериорированные (ЛО);
- 3 — крысы с введением  $A\beta_{25-35}$ , которым через 1 ч после операции вводили интраназально по 10 мкл дистиллированной воды ( $A\beta_{25-35} + H_2O$ );
- 4 — животные, которым по той же схеме интраназально вводили водный раствор АТ-Глу в дозе 300 мкг/кг ( $A\beta_{25-35} + АТ-Глу$ );
- 5 — животные, которым по той же схеме интраназально вводили водный раствор  $\gamma$ -глобулина от интактных кроликов в дозе 300 мкг/кг ( $A\beta_{25-35} + \gamma$ -глобулин).

АТ-Глу получали из сыворотки крови кроликов породы шиншилла, иммунизированных конъюгатом глутамата с бычьим сывороточным альбумином, синтезированным с помощью глутарового альдегида [17]. АТ-Глу в сыворотках крови иммунизированных кроликов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием в качестве тест-антигена конъюгат глутамата с гетерологичным белковым носителем (с  $\gamma$ -глобулином лошади), который синтезировали по той же методике. Титр антител в сыворотке крови иммунизированных кроликов составил 1:1024. Антитела в виде  $\gamma$ -глобулиновой фракции выделяли из сыворотки крови иммунизированных кроликов методом переосаждения сульфатом аммония и очищали диализом. Выделенные АТ-Глу лиофилизировали и хранили при 4°C.

В базальные ядра Мейнерта (координаты: АР -1,4; ОL 2,7; Н 8,7) вводили 2 мкл водного раствора 0,4 нмоль  $A\beta_{25-35}$ . В качестве наркоза применяли хлоралгидрат в дозировке 300 мг/кг внутривентрикулярно [14]. Ложнопериорированным животным в том же объеме вводился физиологический раствор (0,9% раствор NaCl).

На третьи и 14-е сутки после операции у животных в поведенческой серии вырабатывали УРПИ. Камера для УРПИ состояла из освещенного и темного отсеков (каждый размером 25×40×25 см), разделенных дверцей [10]. Для выработки УРПИ крысу помещали в освещенный отсек хвостом к закрытой дверце на 120 с для ознакомления с обстановкой. Затем дверцу открывали, и животное, в силу врожденного норкового рефлекса, переходило в темную часть камеры (регистрировали время этого перехода — латентный период 1, ЛП<sub>1</sub>); максимальное время наблюдения после открытия дверцы составляло 180 с. Сразу после захода в темный отсек дверцу закрывали и через металлические прутья пола камеры наносили животному электрокожное раздражение (0,8 мА, 3 с).

Через 24 часа тестировали сохранность выработанного навыка. Для этого крысу помещали в освещенный отсек при открытой дверце и фиксировали время перехода животного в темную камеру (латентный период 2, ЛП<sub>2</sub>); максимальное время наблюдения после помещения крысы в освещенный отсек составляло 180 с. Формирование долговременных ассоциативных связей между переходом в темный отсек и отрицательным подкреплением оценивали по разности латентных периодов перехода в темную камеру в день выработки УРПИ и в день тестирования (ΔЛП). Кроме того, в каждой группе определяли относительное количество животных, демонстрировавших максимально возможный уровень выполнения навыка, то есть не совершивших переход в темный отсек в течение 180 с после помещения в камеру в день тестирования.

На третьи и 14-е сутки после операции у животных биохимической серии выделяли на холоду образцы префронтальной коры, гипоталамуса и гиппокампа, а затем гомогенизировали в 750 мкл охлажденного лизирующего буфера (150 мМ NaCl, 1% Тритон X-100, 0,5% дезоксихолат натрия, 50 мМ Трис, 5 мМ дитиотреитол, 2 мМ ЭДТА; рН 8.0) на гомогенизаторе «DIAH 100» при 5000 об./мин в течение 15 с. Гомогенат центрифугировали при 4°C при 10 000 g в течение 15 мин [8].

Концентрацию белка в супернатантах определяли колориметрически при 600 нм с применением пирогаллолового красного («А/О Юнимед», Россия). Активность каспазы-3 выявляли, инкубируя при 37°C аликвоты су-

пернатанта (300 мкг белка) в присутствии 250 мкл инкубирующего буфера, содержащего 200 мкМ субстрата каспазы-3 — ацетил-Asp-Glu-Val-Asp-п-нитроанилида (Ac-DEVD-p-nitroanilide) (A-2559, «Sigma-Aldrich», США). Состав буфера для инкубации включал 20 мМ НЕРЕС (рН 7,5), 5 мМ дитиотреитол, 2 мМ ЭДТА [8]. Высвобождение в реакционную смесь п-нитроанилина оценивали через 30 мин спектрофотометрически при 405 нм на Microplate Reader «ImmunoChem-2100» («High Technology Inc.», США). Активность каспазы-3 рассчитывали по скорости высвобождения п-нитроанилина в пмоль/мин на 1 мг белка по формуле:

$$E = (A_{405} \times d) / (\varepsilon \times t \times m),$$

где:

$A_{405}$  — оптическая плотность при  $\lambda=405$  нм;

$d$  — коэффициент разведения, равный для каждого образца  $(V_{\text{аликвоты}} + 250) / 250$ , поскольку в каждую лунку планшета ридера помещали только 250 мкл образца;

$\varepsilon$  — молярный коэффициент экстинкции п-нитроанилина (10500);

$t$  — время измерения (30 мин);

$m$  — масса аликвоты белка (0,3 мг).

Для подтверждения специфичности гидролиза ацетил-Asp-Glu-Val-Asp-п-нитроанилида каспазой-3 опытные пробы дополнительно инкубировали в присутствии 20 мкМ ингибитора каспазы-3 Ac-DEVD-CHO (A-0835, «Sigma-Aldrich», США). В качестве отрицательных контролей отдельно инкубировали аликвоты супернатантов без добавления субстрата для каспазы-3.

Для статистической обработки экспериментальных данных применяли  $H$ -критерий Крускала—Уоллиса с последующим *post-hoc* анализом по  $U$ -критерию Манна-Уитни, являющихся однофакторными

критериями непараметрической статистики, поскольку показатели каждой из выборок не соответствуют закону нормального распределения (установлено по  $W$ -критерию Шапиро—Уилка для малых выборок,  $p < 0,05$ ). Для оценки достоверности различий дихотомически распределенной дискретной величины — число животных, показавших максимально возможный уровень выполнения УРПИ — использован критерий  $\chi^2$  ( $p < 0,025$ ). Парное сравнение показателей латентных периодов захода в темную камеру при УРПИ в двух связанных выборках (в пределах одного временного срока) проводили с использованием парного непараметрического  $T$ -критерия Вилкоксона ( $p < 0,05$ ).

### Результаты и обсуждение

В поведенческой серии экспериментов через 24 ч после нанесения отрицательного подкрепления (в 3 сут.) латентный период захода в темный отсек у животных групп (И), (ЛО) и ( $A\beta_{25-35}$  + АТ-Глу) возрастал в 72 раза, тогда как у группы ( $A\beta_{25-35}$  +  $\gamma$ -глобулин) — всего лишь в 1,5 раза, а у группы ( $A\beta_{25-35}$  +  $H_2O$ ) не наблюдалось существенных изменений этого параметра, отражающего степень закрепления УРПИ (по сравнению с показателями в день обучения). Подобная тенденция изменений ЛП<sub>2</sub> наблюдалась и в следующей временной точке (14 сут.): латентный период захода в темный отсек у крыс групп (И), (ЛО) и ( $A\beta_{25-35}$  + АТ-Глу) возрастал в 27,7, 17,1, и 27,7 раза соответственно, в то время как у группы ( $A\beta_{25-35}$  +  $\gamma$ -глобулин) — возрастал только в 2,4 раза, а у группы ( $A\beta_{25-35}$  +  $H_2O$ ) оставался без изменений (по сравнению с показателями в день обучения; таблица).

При выработке УРПИ в контроле процент животных, не перешедших в темный отсек в течение

Таблица

Антиамнестические эффекты АТ-Глу на третьи и 14-е сутки экспериментальной БА (медиана  $\pm$  25трети75% квантили)

Группа крыс	Временные характеристики УРПИ, с					
	ЛП <sub>1</sub>		ЛП <sub>2</sub>		ΔЛП	
	3 сутки N=2,62 (p=0,623)	14-е сутки N=3,39 (p=0,494)	3 сутки N=13,16 (p=0,01)	14-е сутки N=16,74 (p=0,002)	3 сутки N=14,67 (p=0,005)	14-е сутки N=14,64 (p=0,005)
(И)	2,5 (2; 3)	6,5 <sup>#</sup> (5; 9)	180 <sup>Δ</sup> (150; 180)	180 <sup>Δ</sup> (180; 180)	177 (137; 178)	171,5 (169; 175)
(ЛО)	2,5 (1; 10)	10,5 <sup>#</sup> (4; 12)	180 <sup>Δ</sup> (164; 180)	180 <sup>Δ</sup> (175; 180)	173,5 (163; 178)	168,5 (165; 176)
( $A\beta_{25-35}$ + $H_2O$ )	8,5 (2; 12)	9,5 (7; 15)	8 <sup>**</sup> , <sup>∅</sup> (2; 43)	9,5 <sup>**</sup> , <sup>∅</sup> (7; 22)	6*, <sup>∅</sup> (-8; 31)	1*, <sup>∅</sup> (0; 10)
( $A\beta_{25-35}$ + АТ-Глу)	2,5 (1; 5)	6,5 (4; 8)	180 <sup>Δ</sup> (180; 180)	180 <sup>Δ</sup> (180; 180)	176 (168; 179)	172,5 (170; 174)
( $A\beta_{25-35}$ + $\gamma$ -глобулин)	15 (1; 32)	6 (5; 7)	20,5 <sup>**</sup> , <sup>∅</sup> (3; 180)	14,5 <sup>**</sup> , <sup>∅</sup> (10; 30)	19,5 <sup>**</sup> , <sup>∅</sup> (-20; 148)	9 <sup>**</sup> , <sup>∅</sup> (5; 9)

Примечание. ЛП<sub>1</sub> — латентный период в день выработки УРПИ; ЛП<sub>2</sub> — латентный период через 24 ч после выработки УРПИ; ΔЛП — разность значений латентных периодов в день тестирования и день выработки УРПИ. В графах с указанием временной точки приведены значения  $H$ -критерия Крускала—Уоллиса и вероятности ошибки. *Post-hoc* анализ достоверен здесь и на рис. 3 при: \*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,05$  при сравнении с интактным контролем; <sup>∅</sup>  $p < 0,01$ , <sup>∅∅</sup>  $p < 0,05$  при сравнении с группой ( $A\beta_{25-35}$  + АТ-Глу); #  $p < 0,01$ , ##  $p < 0,05$  при сравнении с 3-ми сутками —  $U$ -критерий Манна—Уитни; <sup>Δ</sup>  $p < 0,05$  при сравнении ЛП<sub>2</sub> с ЛП<sub>1</sub> —  $T$ -критерий Вилкоксона.

180 с, т.е. демонстрировавших максимально возможный уровень выполнения навыка, составило по 83,3% крыс на третьей и 14-е сут., в то время как у опытных крыс с введением  $A\beta_{25-35}$  — только по 16,7% животных ( $p < 0,025$ ).

В биохимической серии на третьи сутки после начала эксперимента активность каспазы-3 достоверно увеличивалась в группе крыс ( $A\beta_{25-35} + H_2O$ ) в префронтальной коре в 1,4 раза ( $p < 0,01$ ), а в гиппокампе — в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ) при сравнении с группой (И). В свою очередь, интраназально введенные АТ-Глу на фоне экспериментальной БА снижали повышенные показатели активности каспазы-3 ( $p < 0,01$ ): в префронтальной коре — в 1,5 раза, а в гиппокампе — в 1,8 раза (по сравнению с группой ( $A\beta_{25-35} + H_2O$ )).

В гипоталамусе отличий между экспериментальными группами не обнаружено. Тем не менее, следует отметить, что показатели активности каспазы-3 в

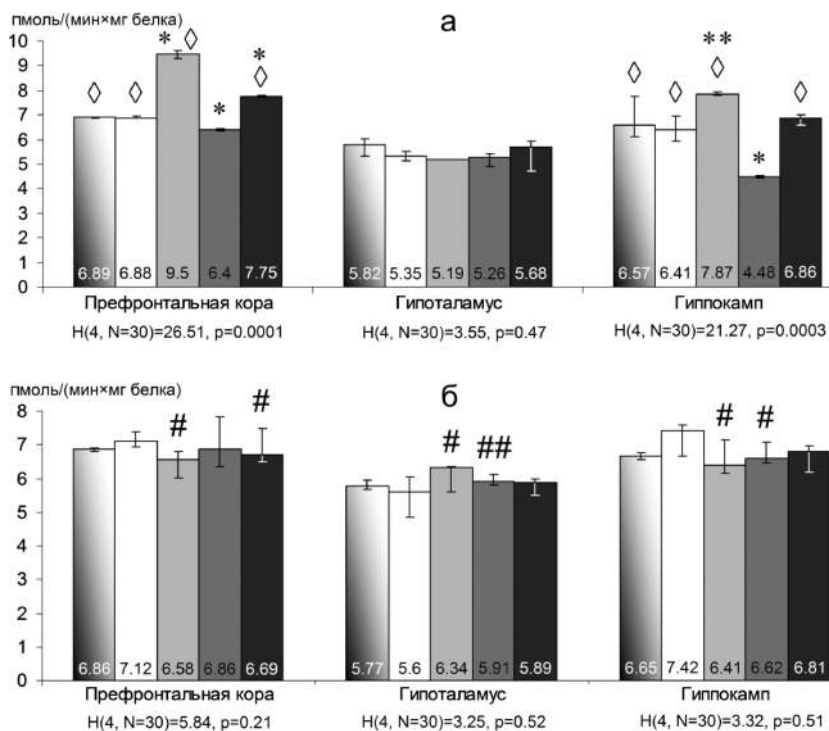
группах (И), (ЛО), ( $A\beta_{25-35} + H_2O$ ) и ( $A\beta_{25-35} + \gamma$ -глобулин) в этой структуре головного мозга были ниже, чем в префронтальной коре и гиппокампе (рисунок).

На 14-е сут. изменений в активности каспазы-3 во всех исследованных структурах выявлено не было. Однако в группе ( $A\beta_{25-35} + H_2O$ ) в образцах префронтальной коры и гиппокампа отмечается достоверное снижение повышенных на третьи сут. показателей активности каспазы-3.

В аликвотах образцов, к которым добавляли ингибитор каспазы-3, и в отрицательных контролях активности каспазы-3 выявлено не было.

Интраназальное введение  $\gamma$ -глобулина не оказывало влияния на активность каспазы-3 в исследуемых областях головного мозга крыс после интоксикации  $A\beta_{25-35}$  (рисунок).

Известно, что  $A\beta$  способен блокировать синаптическую передачу, изменять гиппокампальную долго-



Влияние интраназального введения АТ-Глу на активность каспазы-3 в структурах головного мозга крыс экспериментальной БА (медиана  $\pm$  25%–75% квантили):

а) на третьи сутки; б) на 14-е сутки (б).

По оси абсцисс столбцами обозначены группы крыс:

столбцы с градиентом — (И);

белые столбцы — (ЛО);

светло-серые столбцы — ( $A\beta_{25-35} + H_2O$ );

серые столбцы — ( $A\beta_{25-35} + \text{АТ-Глу}$ );

темно-серые столбцы — ( $A\beta_{25-35} + \gamma$ -глобулин).

Под осью абсцисс представлены значения Н-критерия Крускала–Уоллиса для активности каспазы-3 для каждой из структур мозга с указанием вероятности ошибки.

По оси ординат указана активность каспазы-3 в пмоль/(мин  $\times$  мг белка) п-нитроанилина; внутри столбцов приведены значения медиан для соответствующей группы.

временную потенциацию и запускать нейрональную гибель [19]. На третьей и 14-е сут. после введения в мозг  $A\beta_{25-35}$  у крыс развивались значительные нарушения долговременной памяти, выражающиеся в снижении абсолютных значений латентного времени перехода в темную камеру при воспроизведении УРПИ через 24 ч после обучения ( $LP_2$ ), а также в уменьшении показателя его возрастания в день тестирования относительно дня обучения ( $\Delta LP$ ) по сравнению со значениями, полученными у интактного контроля (таблица).

Таким образом, введение  $A\beta_{25-35}$  вызывает амнестический эффект, нарушая формирование и/или хранение долговременной памяти. Анализ динамики выполнения УРПИ крысами, получавшими интраназально АТ-Глу через час после инъекций  $A\beta_{25-35}$ , выявил, что на третьей и 14-е сут. эксперимента показатели долговременной памяти у них не отличались от контрольного уровня. Интраназальное введение  $\gamma$ -глобулина крысам через час после введения  $A\beta_{25-35}$  не оказало влияния на уровень воспроизведения навыка: при тестировании максимальный уровень выполнения навыка в этой группе составил 33,3 и 16,7% случаев на третьей и 14-е сутки соответственно (таблица).

На третьей сут. в префронтальной коре и гиппокампе нами обнаружено повышение активности каспазы-3 после введения  $A\beta_{25-35}$ . Имеющиеся в литературе данные подтверждают наблюдаемую в гиппокампе картину [6]. К 14-м сут. эксперимента активность каспазы-3 в группе ( $A\beta_{25-35} + H_2O$ ) в префронтальной коре и гиппокампе возвращается к значениям интактного контроля и даже снижается при сравнении с третьими сутками. Это можно объяснить либо запуском каспазо-независимого пути программируемой гибели клеток префронтальной коры и гиппокампа к 14-м сут. наблюдения, либо плейотропным действием каспазы-3, принимающей участие не только в обеспечении процессов программируемой гибели, но и в нейропластичности. Множество эффектов данной цистеиновой протеазы связано с большим количеством расщепляемых ею субстратов [9].

АТ-Глу снижали повышенную на третьей сутки активность каспазы-3 в префронтальной коре и гиппокампе, однако не блокировали ее полностью, что, вероятно, можно рассматривать как дополнительный положительный эффект указанных антител, поскольку ингибирование каспазы-3 приводит к нарушению длительной потенциации, выявленной ранее на срезах гиппокампа [4]. Также известно, что при введении АТ-Глу здоровым крысам они не оказывают влияния на мнестические функции [1].

В наших экспериментах установлено, что активность каспазы-3 в гипоталамусе среди групп живот-

ных не изменяется как на третьей, так и на 14-е сутки эксперимента. Отсутствие эффектов в гипоталамусе можно объяснить отсутствием эфферентных проекций, идущих к нему от ядер Мейнерта [15].

Гиперактивация ионотропных глутаматных NMDA-рецепторов при БА, а не возрастание количества глутамата является существенной особенностью хронических нейродегенеративных процессов [11]. Вероятно, АТ-Глу способны воздействовать на ионотропные глутаматные рецепторы. Известно, что при относительно сохранных механизмах, обеспечивающих фазическую активацию NMDA-рецепторов, накопление  $\beta$ -амилоида при БА приводит к развитию их тонической гиперактивации [16]. По-видимому, АТ-Глу могут выступать как антагонисты к NMDA-рецепторам. Имеются свидетельства о нарушении механизмов формирования, консолидации и реконсолидации памяти при введении NMDA-антагонистов, однако в условиях развития патологических процессов, как и при старении, соединения этого класса могут восстанавливать нарушенные когнитивные функции [5, 7]. Известны факты, свидетельствующие о том, что антагонисты NMDA-рецепторов могут оказывать стимулирующее влияние на обучение и память [20].

Недавно показано, что при экспериментальной БА АТ-Глу влияют на транскрипцию: обнаружено репрессирующее влияние на транскрипцию гена  $\beta$ -полипептида фрагментирующего ДНК фактора, который активируется каспазой-3 при апоптозе [3].

Выявленное защитное действие АТ-Глу является дополнительным доказательством вовлечения иммунной системы в поддержание гомеостаза центральной нервной системы. Влияние малоизученного класса соединений — антител к линейным молекулам нейромедиаторов — представляет особый интерес с точки зрения разработки неинвазивных иммунологических подходов в патогенетической терапии хронических нейродегенеративных повреждений головного мозга. Наблюдаемые нами результаты интраназального введения АТ-Глу, вероятно, можно связать с их триггерным (пусковым) защитным эффектом от нейротоксического влияния  $A\beta_{25-35}$  на клетки мозга.

### Список литературы

1. Горбатов В.Ю., Трекова Н.А., Фомина В.Г., Давыдова Т.В. Амнестическое действие антител к глутамату при экспериментальной болезни Альцгеймера // Бюл. exper. биол. — 2010. — Т. 150, №7. — С. 28-30.
2. Давыдова Т.В., Воскресенская Н.И., Горбатов В.Ю. и др. Особенности образования аутоантител к глутамату при деменциях альцгеймеровского типа // Бюл. exper. биол. — 2009. — Т. 147, №4. — С. 385-387.
3. Колобов В.В., Давыдова Т.В., Захарова И.А. и др. Репрессирующее влияние антител к глутамату на эксп-

рессию гена *Dffb* в мозге крыс при экспериментальной болезни Альцгеймера // Молекуляр. биология. — 2012. — Т. 46, №5. — С. 757-765.

4. **Кудряшов И.Е., Яковлев А.А., Кудряшова И.В., Гуляева Н.В.** Ингибирование каспазы-3 блокирует длительную потенциацию в срезах гиппокампа // Журн. высш. нерв. деят. — 2003. — Т. 53, №5. — С. 537-540.

5. **Солнцева С.В., Никитин В.П.** Эффекты агонистов NMDA рецепторов глутамата и серотонина на разных стадиях амнезии, вызванной нарушением реконсолидации долговременной памяти // Нейрохимия. — 2010. — Т. 27, №3. — С. 214-220.

6. **Степанчиков М.Ю., Онуфриев М.В., Мусеева Ю.В.** и др. Влияние фактора некроза опухоли-альфа и бета-амилоидного пептида (25-35) на показатели свободнорадикального окисления и активность каспазы-3 в мозге крыс // Нейрохимия. — 2006. — Т. 23, №3. — С. 217-222.

7. **Сторожева З.И., Солнцева С.В., Никитин В.П.** и др. Необратимая амнезия у крысы и виноградной улитки при нарушении реконсолидации ассоциативной памяти антагонистом рецепторов NMDA рецепторов // Бюл. эксперим. биол. — 2010. — Т. 150, №9. — С. 253-258.

8. **Шерстнёв В.В., Юрасов В.В., Сторожева З.И., Грудень М.А.** Сопряжённые процессы нейроглиогенеза и апоптоза в зрелом мозге у крыс // Нейрохимия. — 2008. — Т. 25, №4. — С. 309-316.

9. **Яковлев А.А., Гуляева Н.В.** Плейотропные функции протеиназ мозга: методические подходы к исследованию и поиск субстратов каспазы // Биохимия. — 2011. — Т. 76, №10. — С. 1325-1334.

10. **Bures J., Buresova O., Huston J.P.** Techniques and basic experiments for the study of brain behavior. — Amsterdam: Elsevier, 1987. — 227 p.

11. **Farooqui A.A.** Neurochemical aspects of neurodegenerative disease // Neurochemical aspects of neurotraumatic and neurodegenerative diseases / Ed. Farooqui A.A. — New York: Springer, 2010. — P. 249-324.

12. **Gervais F.G., Xu D., Robertson G.S.** et al. Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amy-

loid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation // Cell. — 1999. — Vol. 97, №3. — P. 395-406.

13. **Harkany T., Abraham I., Timmerman W.** et al. Beta-amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis // Eur. J. Neurosci. — 2000. — Vol. 12, №8. — P. 2735-2745.

14. **Harkany T., O'Mahony S., Kelly J.P.** et al. Beta-amyloid(Phe(SO<sub>3</sub>H)<sub>24</sub>)<sub>25-35</sub> in rat nucleus basalis induces behavioral dysfunctions, impairs learning and memory and disrupts cortical cholinergic innervation // Behav. Brain Res. — 1998. — Vol. 90, №2. — P. 133-145.

15. **Mesulam M.M., Mufson E.J., Wainer B.H., Levey A.I.** Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6) // Neurosci. — 1983. — Vol. 10, №4. — P. 1185-1201.

16. **Parson C.G., Stoffler A., Danysz W.** Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system — too little activation is bad, too much is even worse // Neuropharmacol. — 2007. — Vol. 53, №6. — P. 699-723.

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

18. **Su J.H., Zhao M., Anderson A.J.** et al. Activated caspase-3 expression in Alzheimer's and aged control brain: correlation with Alzheimer pathology // Brain Res. — 2001. — Vol. 898, №2. — P. 350-357.

19. **Walsh D.M., Selkoe D.J.** Aβ oligomers — a decade of discovery // J. Neurochem. — 2007. — Vol. 101, №5. — P. 1172-1184.

20. **Weiskrantz L., Mondadori C.** MK-801 can facilitate passive avoidance memory when retention is not present in control animals, and can fail to facilitate when it is present // Psychopharmacology (Berl.) — 1991. — Vol. 105, №2. — P. 145-150.

Поступила 21.12.12

#### Сведения об авторах:

**Фомина Валентина Гавриловна**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории нейроиммунопатологии ФГБУ «ННЦ» РАМН

**Горбатов Виктор Юрьевич**, канд. мед. наук, мл. науч. сотр. лаборатории нейроиммунопатологии ФГБУ «ННЦ» РАМН

**Давыдова Татьяна Викторовна**, д-р мед. наук, главн. науч. сотр. лаборатории нейроиммунопатологии ФГБУ «ННЦ» РАМН



С.А. Мензиков, М.Н. Карпова, М.В. Калинина

## Прямое вовлечение глюкозы и $Mg^{2+}$ -АТФ в регуляцию ГАМК<sub>A</sub>-сопряженной $Cl^-$ , $HCO_3^-$ -АТФазы плазматических мембран мозга крыс в экспериментах *in vitro*

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

Исследовано влияние глюкозы и  $Mg^{2+}$ -АТФ на сопряженную с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ -АТФазу плазматических мембран мозга крыс, состоящую из «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы, активируемой ионами  $Cl^-$  и  $HCO_3^-$ . Установлено, что глюкоза (1–10 мкМ) снижает активность «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы на 17% и полностью устраняет активацию фермента 10 мМ  $Cl^-$  + 2 мМ  $HCO_3^-$ . Обнаружен различный эффект глюкозы и  $Mg^{2+}$ -АТФ на активацию фермента различными концентрациями ионов  $Cl^-$  +  $HCO_3^-$ . Показано, что в диапазоне высоких концентраций (>1 мМ) субстрата ( $Mg^{2+}$ -АТФ) активирование фермента низкими концентрациями 10 мМ  $Cl^-$  + 2 мМ  $HCO_3^-$  не происходит. Однако, в присутствии глюкозы (10 мМ) ингибирующий эффект субстрата на фермент нивелируется, т.е. активность  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ -АТФазы восстанавливается. В то же время, в присутствии высоких концентраций 40 мМ  $Cl^-$  + 2 мМ  $HCO_3^-$  в среде инкубации ингибирующий эффект глюкозы и  $Mg^{2+}$ -АТФ на активность фермента незначителен (~20%). Делается вывод о прямом вовлечении глюкозы и  $Mg^{2+}$ -АТФ в регуляцию ГАМК<sub>A</sub>-сопряженной  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ -АТФазной активности нейрональных мембран при различных концентрациях анионов в среде инкубации.

**Ключевые слова:** глюкоза,  $Mg^{2+}$ -АТФ,  $Mg^{2+}$ -АТФаза, плазматические мембраны мозга крыс,  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$

S.A. Menzikov, M.N. Karpova, M.V. Kalinina

## Direct involvement of the glucose and $Mg^{2+}$ -ATP in the regulation of the GABA<sub>A</sub>-coupled $Cl^-$ , $HCO_3^-$ -activated $Mg^{2+}$ -ATPase of the plasma membrane from rat brain *in vitro* experiences

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

Effect of the glucose and  $Mg^{2+}$ -ATP on the coupled with GABA<sub>A</sub>-receptor  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ -activated  $Mg^{2+}$ -ATPase of the plasma membranes from rat brain involving from «basal»  $Mg^{2+}$ -ATPase which it is activated by  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$  ions it was investigated. The glucose (1–10 mM) decreased the «basal»  $Mg^{2+}$ -ATPase activity on 17% and completely eliminated the enzyme activation by 10 mM  $Cl^-$  + 2 mM  $HCO_3^-$  ions. The variety effect of the glucose and  $Mg^{2+}$ -ATP on the activation of the «basal»  $Mg^{2+}$ -ATPase by variety concentrations of anions it was established. So it was found that in the presence  $Mg^{2+}$ -ATP in the incubation medium >1 mM the enzyme activation by 10 mM  $Cl^-$  + 2 mM  $HCO_3^-$  ions not appear. However, in the presence of the glucose (10 mM) the inhibiting effect of the  $Mg^{2+}$ -ATP on the enzyme is disappears and  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ -ATPase activity is restored. While, in the presence of the high concentrations 40 mM  $Cl^-$  + 8 mM  $HCO_3^-$  in the incubation medium the inhibiting effect of the glucose and  $Mg^{2+}$ -ATP it was negligible (~20%). It was conclusion about direct involvement of the glucose and  $Mg^{2+}$ -ATP in the regulation of the coupled with GABA<sub>A</sub>-receptor  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ -ATPase activity of the neuronal membrane under different concentration anions in the incubation medium.

**Key words:** glucose,  $Mg^{2+}$ -ATP,  $Mg^{2+}$ -ATPase, plasma membranes from rat brain, chloride, bicarbonate

В плазматических мембранах нейронов мозга крыс существует ГАМК<sub>A</sub>-сопряженная  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ -АТФаза, состоящая из «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы, активируемой одновременно ионами  $Cl^-$  и  $HCO_3^-$  при их соот-

ношении 5:1, и участвующая в ГАМК<sub>A</sub>-индуцируемых  $Cl^-$ / $HCO_3^-$ -обменных процессах [2, 3]. Обнаружено, что фермент вовлекается в конвульсант-индуцируемую судорожную активность мозга крыс [4]. Известно, что патогенез эпилепсии и судорожных состояний зависит не только от нарушения функционирования ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов, но и от энергетического состояния мозга, и в первую очередь, от метаболизма глюкозы [1, 5]. Кроме того,

Для корреспонденции: Карпова Маргарита Николаевна, д-р биологических наук, зав. лабораторией эпилептогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: karpovamn@gmail.com

показано, что функциональная активность транспортных АТФаз, а также «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы нейрональных мембран находится под контролем гликолитического АТФ [7, 13].

*Цель исследования* — выяснение влияния глюкозы и  $Mg^{2+}$ -АТФ на активность «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы в отсутствие и присутствии анионов в экспериментах *in vitro*.

### Методика

Эксперименты выполнены на 25 крысах самцах Вистар массой 160—180 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище. 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.

#### Получение фракции микросом

Для получения фракции микросом, обогащенной плазматическими мембранами, животных декапитировали. Извлекали кору мозга и гомогенизировали при 4°C в соотношении 1:8 в 10 мМ HEPES-Tris буфере, pH 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 в 10 мМ HEPES-Tris буфере, pH 7.2 и использовали для определения АТФазной активности.

#### Исследования *in vitro*

Для определения активности фермента, микросомальный препарат (~20 мкг) вносили в 0,5 мл среды инкубации, содержащей 10 мМ HEPES-Tris буфер, pH 7.2, 0,7—3 мМ  $MgSO_4$ , 0,7—3 мМ tris-АТФ, 10 мМ NaCl + 2 мМ  $NaHCO_3$  или 40 мМ NaCl + 8 мМ  $NaHCO_3$ , и глюкозу (1—10 мМ). Удельную АТФазную активность оценивали по приросту неорганического фосфора ( $\Phi_i$ ) в 0,5 мл инкубационной среды при 30°C в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением в среду инкубации 1,8 мл 30%-ной  $H_2SO_4$ . Содержание фосфора в пробах определяли методом Чена и выражали в мкмоль  $\Phi_i$ /ч на 1 мг белка [2]. «Базальную»  $Mg^{2+}$ -АТФазную активность рассчитывали как разность активностей в присутствии и в отсутствие  $MgSO_4$ . Активность  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ -активируемой  $Mg^{2+}$ -АТФазы

( $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ -АТФазы) оценивали по разности между  $Mg^{2+}$ -АТФазными активностями в присутствии и в отсутствие  $NaCl + NaHCO_3$ .

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). Достоверными считали различия между группами при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

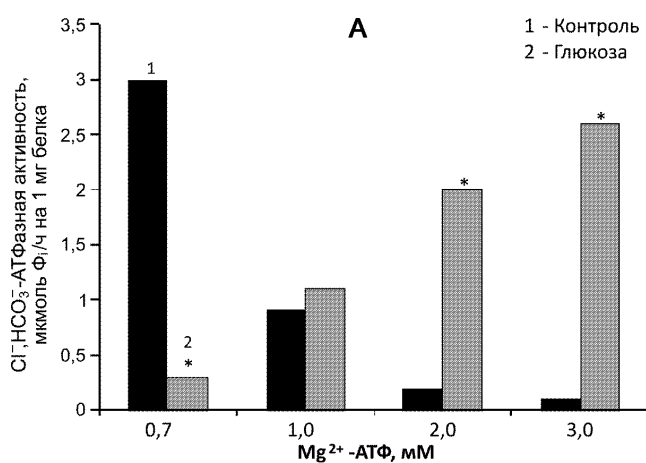
Для выяснения специфичности действия глюкозы исследовали ее влияние на «базальную»  $Mg^{2+}$ -АТФазу и активирующее действие анионов на активность фермента. Результаты исследования показали, что в исследуемой фракции плазматических мембран активность «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы микросом мозга крыс составляет 7,8 мкмоль  $\Phi_i$ /ч на 1 мг белка. В присутствии 10 мМ  $Cl^- + 2$  мМ  $HCO_3^-$  активность  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ -АТФазы составила 3,2 мкмоль  $\Phi_i$ /ч на 1 мг белка. Глюкоза в диапазоне концентраций 1—10 мМ снижает активность «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы на 17% и полностью устраняет активацию фермента анионами.

Ранее нами показано, что фермент активируется как низкими (~10 мМ  $Cl^- + \sim 2$  мМ  $HCO_3^-$ ), так и высокими (~40 мМ  $Cl^- + \sim 8$  мМ  $HCO_3^-$ ) концентрациями анионов и вовлечен в ГАМК<sub>A</sub>-индуцируемые  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ -обменные процессы [3]. Кроме того, было установлено, что активация фермента низкими концентрациями анионов, ингибируется в присутствии субстрата  $Mg^{2+}$ -АТФ в среде инкубации >1 мМ. Поскольку полученные данные показали чувствительность  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ -АТФазной активности к глюкозе, представлялось важным исследовать ее влияние на фермент при его активации различными концентрациями анионов. Из результатов, представленных на рис. 1, видно, что  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ -АТФазная активность, выявляемая при низких концентрациях анионов, ингибируется концентрациями  $Mg^{2+}$ -АТФ выше 1 мМ. Однако в присутствии 10 мМ глюкозы ингибирующий эффект  $Mg^{2+}$ -АТФ на фермент нивелируется. В то же время при активации фермента высокими концентрациями анионов, ингибирующий эффект, как субстрата, так и глюкозы незначителен (рис. 2). Так, в присутствии 3 мМ  $Mg$ -АТФ в среде инкубации, активность  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ -АТФазы ингибируется на ~20%.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о чувствительности АТФазы плазматических мембран мозга крыс к глюкозе. Однако влияние последней на ферментативную активность носит различный характер в зависимости от концентрации анионов и субстрата  $Mg^{2+}$ -АТФ в среде инкубации.

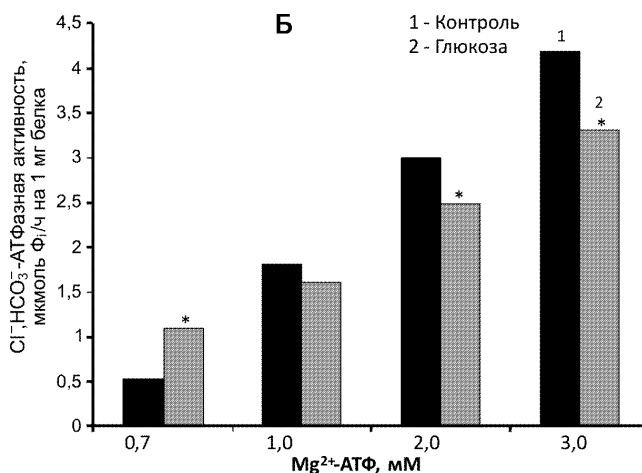
Известно, что торможение нейрона, по сравнению с возбуждением, характеризуется более быстрой и интенсивной активацией энергетического обмена [1, 5]. В частности, метаболизм глюкозы в мозге определяет уровень АТФ в нейронах, что является жизненно важным для функционирования ЦНС. Кроме того, гипер- или гипогликемия влияют на липидный состав и текучесть плазматических мембран и, как следствие, изменяют функциональную активность мембраносвязанных транспортных АТФаз  $P$ -типа, таких, как  $Na^+, K^+$ -АТФаза и  $Ca^{2+}$ -АТФаза, а также «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы, роль которой в нейрональной мембране окончательно не установлена [7, 13]. Так, показано, что глюкоза в концентрации 1, 2 и 3 мМ ингибировала активность  $Mg^{2+}$ -АТФазы на 80, 50 и 40% соответственно [12]. В нашем исследовании глюкоза (5—10 мМ) также ингибирует активность «базальной»  $Mg^{2+}$ -АТФазы на 17%. Кроме того, присутствие в среде инкубации 10 мМ глюкозы ингибирует активацию фермента низкими концентрациями (10 мМ  $Cl^-$  + 2 мМ  $HCO_3^-$ ) и практически не влияет на активацию фермента высокими концентрациями анионов. Эти результаты подтверждают ранее полученные данные о наличии у фермента двух устойчивых состояний, зависи-

мых от концентрации анионов и АТФ, что позволяет предполагать физиологическое значение влияния глюкозы на активность фермента [2]. В частности, в нейрональных мембранах взрослых животных ГАМК, взаимодействуя с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами, увеличивает транспорт  $Cl^-$  в нейрон, в результате чего происходит гиперполяризация мембранного потенциала [5]. В то же время, при увеличении концентрации медиатора или частоты его воздействия на рецептор, наблюдаемое торможение переходит в возбуждение мембранного потенциала [11]. Общеизвестна важная роль  $HCO_3^-$  в возникновении ГАМК<sub>A</sub>-возбуждения, однако, в отношении ионов  $Cl^-$  было предложено несколько гипотез. Так, одни авторы считают, что при ГАМК<sub>A</sub>-индуцируемой деполяризации происходит выход  $Cl^-$  из клетки, тогда как другие полагают, что транспорт  $Cl^-$  направлен внутрь нейрона. Так, интенсивная активация ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов индуцирует  $Cl^-/HCO_3^-$ -проводимость, в ходе которой транспорт  $Cl^-$ , направленный из экстрацеллюлярного пространства в нейрон увеличивает концентрацию до 10 мМ, а ионы  $HCO_3^-$  транспортируются из нейрона, их концентрация увеличивается снаружи клетки от 2 мМ [11]. Наряду с этим имеются данные, что при концентрации  $Cl^-$  внутри нейрона выше 40 мМ, полярность двухфазного ГАМК<sub>A</sub>-индуцируемого тока тоже меняется, т.е.  $Cl^-/HCO_3^-$ -ток изменяет свою направленность [9]. Такое предположение подтверждается результатами исследований, в которых установлено, что в нейрональной клетке с высоким содержанием ионов  $Cl^-$  не происходит аккумуляции этих



**Рис. 1.** Влияние глюкозы на активность  $Cl^-, HCO_3^-$ -АТФазы, активируемой низкими концентрациями (10 мМ NaCl + 2 мМ NaHCO<sub>3</sub>) анионов ( $M \pm m$ ): по оси абсцисс — концентрация  $Mg^{2+}$ -АТФ, мМ; по оси ординат — активирующий эффект ионов 10 мМ  $Cl^-$  + 2 мМ  $HCO_3^-$ , мкмоль Ф<sub>1</sub>/ч на 1 мг белка.

\* —  $p < 0,05$  — достоверные отличия от значений активности фермента в контроле ( $n=4$ )



**Рис. 2.** Влияние глюкозы на активность  $Cl^-, HCO_3^-$ -АТФазы, активируемой высокими концентрациями (40 мМ NaCl + 8 мМ NaHCO<sub>3</sub>) анионов ( $M \pm m$ ): по оси абсцисс — концентрация  $Mg^{2+}$ -АТФ, мМ; по оси ординат — активирующий эффект ионов 40 мМ  $Cl^-$  + 8 мМ  $HCO_3^-$ , мкмоль Ф<sub>1</sub>/ч на 1 мг белка.

\* —  $p < 0,05$  — достоверные отличия от значений активности фермента в контроле ( $n=4$ )

анионов, а наоборот,  $\text{Cl}^-$  истощается в начальной фазе ГАМК<sub>A</sub>-индуцируемого постсинаптического тока [10]. Однако известно, что  $\text{Cl}^-$ -АТФаза в нейрональной клетке препятствует аккумуляции  $\text{Cl}^-$  в нейроне, но не его истощению [6]. Эти данные свидетельствуют о том, что в ходе ГАМК<sub>A</sub>-индуцируемой деполяризации, в отличие от ГАМК<sub>A</sub>-индуцируемой гиперполяризации, должна вовлекаться сопряженная с тормозными рецепторами АТФ-зависимая система, участвующая в поддержании концентрации внутриклеточного  $\text{Cl}^-$  за счет энергии гидролиза АТФ. Обнаруженная нами  $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ -АТФаза, которая выявляется как при низких, так и при высоких концентрациях анионов, по-видимому, и является таким ферментом, который гидролизует АТФ и участвует в ГАМК<sub>A</sub>-индуцируемом  $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ -обменном процессе [2, 3]. Однако, как показывают полученные данные, глюкоза регулирует, в каком режиме будет работать фермент, т.е. влияние этой энергетической субстанции на активность ГАМК<sub>A</sub>-сопряженного  $\text{Cl}^-$ -насоса играет важную физиологическую роль не только потому, что, через процессы гликолиза, обеспечивает тормозные рецепторы энергией, но и потому, что она напрямую регулирует определенное направление потока  $\text{Cl}^-$ , которое зависит не только от их концентрации, но и от внутриклеточной концентрации АТФ и ионов  $\text{HCO}_3^-$ . Дальнейшее исследование свойств фермента и роли глюкозы в регуляции АТФ-зависимого ГАМК<sub>A</sub>-индуцируемого транспорта  $\text{Cl}^-$  через нейрональную мембрану может иметь важное значение для выяснения патогенеза ряда заболеваний, в частности эпилепсии. Так, выявлена функциональная связь между эпилептогенезом и снижением метаболизма глюкозы в определенных областях мозга [8].

### Список литературы

1. *Ашмарин И.П., Стукалов П.В., Ещенко и др.* Биохимия мозга. — СПб.: С.-Петербургский университет, 1999. — 328 с.
2. *Мензиков С.А.* АТФ-зависимая  $\text{Cl}^-$ -транспортная система нейрональных мембран: Структурная и функциональная сопряженность с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами, роль в  $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ -обменных процессах, свойства. — Palmarium Academic Publishing, 2012. — 356 с.
3. *Мензиков С.А., Карпова М.Н., Калинина М.В.* Влияние ионов  $\text{HCO}_3^-$  на АТФ-зависимый сопряженный с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторами  $\text{Cl}^-$ -насос плазматических мембран мозга крыс // Бюл. exper. биол. — 2011. — Т. 152, №7. — С. 43-47.
4. *Мензиков С.А., Карпова М.Н., Калинина М.В.* Влияние пикротоксина на ГАМК<sub>A</sub>-сопряженную  $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ -активируемую  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазную активность плазматических мембран мозга крыс в экспериментах in vitro и in vivo // Патогенез. — 2011. — №1. — С. 31-34.
5. *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.
6. *Inagaki C., Hara M., Zeng X.T.* A  $\text{Cl}^-$ -pump in rat brain neurons // J. Exp. Zool. — 1996. — Vol. 275, №4. — P. 262-268.
7. *Kamboj S.S., Chopra K., Sandhir R.* Hyperglycemia-induced alterations in synaptosomal membrane fluidity and activity of membrane bound enzymes: beneficial effect of N-acetylcysteine supplementation // Neuroscience. — 2009. — Vol. 162, №2. — P. 349-358.
8. *Laschet J.J., Kurcewicz I., Minier F.* et al. Dysfunction of GABA(A) receptor glycolysis-dependent modulation in human partial epilepsy // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2007. — Vol. 104, №9. — P. 3472-3477.
9. *Perkins K.L., Wong R.K.S.* Ionic basis of the postsynaptic depolarizing GABA response in hippocampal pyramidal cells // J. Neurophysiol. — 1996. — Vol. 76. — P. 3886-3894.
10. *Perkins K.L.*  $\text{Cl}^-$  accumulation does not account for the depolarizing phase of the synaptic GABA response in hippocampal pyramidal cells // J. Neurophysiol. — 1999. — Vol. 82. — P. 768-777.
11. *Staley K.J., Proctor W.R.* Modulation of mammalian dendritic GABA<sub>A</sub> receptor function by the kinetics of  $\text{Cl}^-$  and  $\text{HCO}_3^-$  transport // J. Physiol. Lond. — 1999. — Vol. 519. — P. 693-712.
12. *Torlinska T., Grochowalska A.* Age-related changes of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activities in rat brain synaptosomes // J. Physiol. Pharmacol. — 2004. — Vol. 55, №2. — P. 457-465.
13. *Tsakiris S., Koromilas C., Schulpis K.H.* Reduced  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity in the hypoglycemic adult rat brain // J. Naturforsch C. — 2001. — Vol. 56, №9-10. — P. 912-914.

Поступила 20.12.12

### Сведения об авторах:

*Мензиков Сергей Арсентьевич*, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. эпилептогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН  
*Калинина Марина Васильевна*, науч. сотр. лаб. эпилептогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН

И.Г. Ребров, М.В. Калинина

## Влияние нарушения целостности синаптических мембран мозга крыс на функциональную активность ГАМК<sub>A</sub>-рецептор/Cl<sup>-</sup>-ионофорного комплекса в ЦНС

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

Исследовали функциональную активность ГАМК<sub>A</sub>-рецептор/Cl<sup>-</sup>-ионофорного комплекса по величине мусцимол-стимулируемого входа радиоактивного изотопа <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> в синаптонейросомы коры головного мозга крыс линии Вистар в условиях изменения структуры и проницаемости нейрональных мембран. Целостность мембран нарушали устранением Ca<sup>+2</sup> и Mg<sup>+2</sup> из среды инкубации и методом замораживания-оттаивания синаптонейросом. В обоих случаях наблюдалось увеличение базального входа <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> в синаптонейросомы, свидетельствующее о повышении неспецифической проницаемости нейрональных мембран, и снижение активности ГАМК<sub>A</sub>-рецептор/Cl<sup>-</sup>-ионофорного комплекса. Сделан вывод о взаимосвязи процессов повреждения нейрональных мембран и снижения тормозных процессов в эпилептическом очаге.

**Ключевые слова:** ГАМК<sub>A</sub>-рецептор, синаптонейросомы, изотоп <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>

I.G. Rebrov, M.V. Kalinina

## Effect of damage integrity rat brain synaptic membranes on the functional activity GABA<sub>A</sub>-receptor/Cl<sup>-</sup>-ionophore complex in the CNS

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

Functional activity of the GABA<sub>A</sub>-receptor/Cl<sup>-</sup> ionophore complex was investigated the muscimol-stimulated entry of the radioactive isotope <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> in synaptoneurosomes in changing the structure and permeability of neuronal membranes. Integrity of the membranes was damaged by removal of Ca<sup>+2</sup> and Mg<sup>+2</sup> from the incubation medium and by the method of freezing-thawing synaptoneurosomes. In both cases, an increase in basal <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> entry into synaptoneurosomes, indicating increased nonspecific permeability of neuronal membranes, and decreased activity the GABA<sub>A</sub>-receptor/Cl<sup>-</sup> ionophore complex. The conclusion about the relationship of processes damage neuronal membranes and reducing the inhibitory processes in the epileptic focus.

**Key words:** GABA<sub>A</sub>-receptor, synaptoneurosomes, isotope <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>

ГАМК<sub>A</sub>-рецептор/Cl<sup>-</sup>-ионофорный комплекс (ГАМК<sub>A</sub>-РК), ключевое звено ГАМК-ергического торможения в ЦНС, играет важную роль в процессе эпилептогенеза. Снижение функциональной активности ГАМК<sub>A</sub>-РК приводит к гиперактивации (эпилептизации) нейронов. Известно, что состояние гиперактивности нейронов в эпилептическом очаге сохраняется даже в отсутствие эпилептического припадка, что подтверждают данные ЭЭГ [10]. Одним из следствий перманентной гиперактивности нейронов является усиление перекисного окисления липидов и активация фосфолипаз с образованием высших жирных кислот из фосфолипидов [5]. Эти процессы приводят к возникновению пор и дефектов структуры в липид-

ном слое нейрональных мембран. Образование пор способствует увеличению неспецифической проницаемости мембраны, что приводит к уменьшению трансмембранных ионных градиентов. Конформационные изменения, возникающие в структуре мембраны, могут вызвать изменение сродства расположенных в мембране рецепторных комплексов к медиаторам и фармакологическим препаратам.

Двухвалентные катионы Ca<sup>+2</sup> и Mg<sup>+2</sup> играют важную роль в стабилизации клеточной мембраны. Они связывают между собой молекулы липидов, обеспечивая их упорядоченное расположение в клеточных мембранах. Устранение Ca<sup>+2</sup> и Mg<sup>+2</sup> из внеклеточной среды приводит к нарушению структуры клеточной мембраны и, как следствие, повышает ее неспецифическую проницаемость [4, 11]. Известно также, что замораживание—оттаивание мембран ме-

Для корреспонденции: Калинина Марина Васильевна, науч. сотр. лаб. эпилептогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: kalinka0304@yandex.ru

няет их структуру. Замораживание липидного бислоя в результате фазового перехода из жидкокристаллического состояния в гель сопровождается появлением липидных пор, часть которых сохраняется при последующем оттаивании [1].

Поскольку ранее нами было показано, что при моделировании процесса эпилептогенеза посредством пентилтетразолового киндинга снижается уровень функциональной активности (ГАМК<sub>A</sub>-РК) [3], то основной задачей данной работы являлось изучение связи между нарушениями проницаемости и структуры нейрональных мембран и функциональной активностью ГАМК<sub>A</sub>-РК синаптонейросом. Нарушение целостности нейрональных мембран моделировали устранением Ca<sup>+2</sup> и Mg<sup>+2</sup> из среды инкубации и методом замораживания—оттаивания синаптонейросом.

### Методика

В опытах использовали 30 самцов крыс линии Вистар массой 170—190 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.

Синаптонейросомы выделяли из коры головного мозга крыс по методике Hollingsworth [9] с некоторыми изменениями [2]. Крyс декапитировали, выделяли кору головного мозга и при 0—4°C, гомогенизировали ее вручную — 5 фрикций в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в среде Кребса—Рингера следующего состава в мМ: NaCl — 145, KCl — 5, MgSO<sub>4</sub> — 1, CaCl<sub>2</sub> — 1, глюкоза — 10, HEPES — 10, рН=7,4 (20°C) в соотношении 1 г ткани на 15 мл среды. Гомогенат последовательно фильтровали через нейлоновые сита (Рахмановский комбинат, Россия) с размером ячеек 300, 99, 60 и 27 мкм. Фильтрат центрифугировали 5 мин при 2700 г, осадок ресуспендировали в том же объеме среды Кребса—Рингера и повторно центрифугировали при тех же условиях. Осадок после второго центрифугирования суспендировали в среде Кребса—Рингера таким образом, чтобы конечная концентрация синаптонейросом по белку была около 4 мг/мл. Синаптонейросомы использовали сразу после выделения. Замену инкубационной среды на среду без Ca<sup>+2</sup>, без Mg<sup>+2</sup> или без Ca<sup>+2</sup> и Mg<sup>+2</sup> производили центрифугированием 5 мин при 2700 г, после чего осадок ресуспендировали в том же объеме соответствующего раствора. Функциональную активность ГАМК<sub>A</sub>-рецептор/Cl<sup>-</sup>-ионофорного комплекса

определяли по методике Shwartz [8]. Вход <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> в синаптонейросомы стимулировали агонистом ГАМК<sub>A</sub>-рецептора мусцимолом. Суспензию синаптонейросом аликвотами по 100 мкл (400 мкг белка) разливали в пробирки и преинкубировали 30 мин при 20°C. Затем в пробы добавляли по 100 мкл раствора Кребса—Рингера, содержащего 0,5 мкКи <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> («Изотоп», Россия) и мусцимол в концентрации от 2 до 100 мкМ. Через 5 с вход <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> в синаптонейросомы останавливали фильтрованием через стекловолочные фильтры GF/C («Whatman», Англия) и промывали трижды четырьмя мл охлажденного до 0—4°C раствора Кребса—Рингера. Фильтры сушили, помещали во флаконы со сцинтиллятором и считали на счетчике РАСВЕТА (ЛКВ, Швеция). Синаптонейросомы использовали сразу после выделения. Мусцимол-стимулируемый вход <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> в синаптонейросомы определяли по разности между входом <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> в присутствии мусцимола и базальным входом изотопа.

Проведено 4 серии опытов. В 1-й серии опытов изучали изменения входа <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> в синаптонейросомы в стандартной среде содержащей 1 мМ Mg<sup>+2</sup>, но без Ca<sup>+2</sup>. 2-я серия опытов была проведена со средой инкубации без Mg<sup>+2</sup>, но с Ca<sup>+2</sup>. В 3-й серии опытов в среде без Mg<sup>+2</sup> и Ca<sup>+2</sup>. Вход <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> в синаптонейросомы в 1—3 сериях опытов определяли через 10 с и 30 мин после изменения среды инкубации. В 4-й серии проводили замораживание синаптонейросом на 24 ч при -15°C и последующее оттаивание в течение 2 ч при комнатной температуре.

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). Достоверными считали различия между группами при p<0,05.

### Результаты и обсуждение

Результаты опытов по исследованию влияния двухвалентных катионов кальция и магния на вход <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> в синаптонейросомы представлены в таблицах: базальный вход представлен в табл. 1, мусцимол-стимулируемый — в табл. 2.

В 1-й серии опытов через 10 с после удаления кальция из среды инкубации синаптонейросом (путем замены стандартной среды на безкальциевую) базальный вход <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> по сравнению с контролем практически не изменялся, тогда как мусцимол-стимулируемый вход уменьшался на 27,8%. Через 30 мин после удаления кальция из среды инкубации было

Таблица 1

Базальный вход  $^{36}\text{Cl}^-$  в синаптонейросомы в нмоль Cl/мг белка через 10 с и через 30 мин

Среда инкубации	Время инкубации	
	10 с	30 мин
Контроль с $\text{Ca}^{+2}$ и $\text{Mg}^{+2}$	43,2±2,3	41,5±3,2
Опыт без $\text{Ca}^{+2}$	44,6±3,5	33,4±2,4
Опыт без $\text{Mg}^{+2}$	42,5±3,9	49,8±9,4
Опыт без $\text{Ca}^{+2}$ и $\text{Mg}^{+2}$	49,4±3,4	58,7±5,0*

Примечание. \* —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем

Таблица 2

Мусцимол-стимулируемый вход  $^{36}\text{Cl}^-$  в синаптонейросомы в нмоль Cl/мг белка через 10 с и через 30 мин

Среда инкубации	Время инкубации	
	10 с	30 мин
Контроль с $\text{Ca}^{+2}$ и $\text{Mg}^{+2}$	31,8±4,2	30,5±4,3
Опыт без $\text{Ca}^{+2}$	20,9±3,1*	32,7±5,2
Опыт мусцимол без $\text{Mg}^{+2}$	16,4±3,9**	19,5±9,8**
Опыт мусцимол без $\text{Ca}^{+2}$ и $\text{Mg}^{+2}$	5,5±3,8*	-0,8±7,1*

Примечание. \* —  $p < 0,01$ ; \*\* —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем

выявлено снижение базального входа  $^{36}\text{Cl}^-$  на 25,6%, а мусцимол-стимулируемый вход практически полностью восстанавливался до контрольного уровня. То есть, устранение  $\text{Ca}^{+2}$  из среды инкубации оказывает влияние на вход  $^{36}\text{Cl}^-$  только на начальном этапе.

Следующая 2-я серия была проведена со средой инкубации без  $\text{Mg}^{+2}$ , но с  $\text{Ca}^{+2}$ . Через 10 с после устранения ионов магния из среды базальный вход  $^{36}\text{Cl}^-$  практически не отличался от контрольного, а мусцимол-стимулируемый вход  $^{36}\text{Cl}^-$  уменьшался до 48,4% от контрольного уровня.

В 3-й серии опытов в среде без  $\text{Ca}^{+2}$  и  $\text{Mg}^{+2}$  через 10 с базальный вход возрастал на 11,9%, а мусцимол-стимулируемый уменьшался в 8,2 раза, через 30 мин базальный вход был выше контрольного на 20%, а мусцимол-стимулируемый был на достоверном нулевом уровне.

В 4-й серии опытов синаптонейросомы подвергали процедуре замораживания—оттаивания. Замораживание синаптонейросом на 24 ч при  $-15^\circ\text{C}$  и последующее оттаивание (2 ч при комнатной температуре) приводило повышению базального входа на 47,5% с 37,1±3,2 до 63,6±4,8 нмоль Cl/мг белка и уменьшению мусцимол-стимулируемого на 56% с 26,9±1,8 до 15,1±3,7 нмоль Cl/мг белка, т.е. результату, подобному эффекту устранение двухвалентных катионов из среды инкубации. С другой стороны, не всякое изменение структуры синаптических мембран приводило к увеличению базального и уменьшению мусцимол-зависимого входа  $^{36}\text{Cl}^-$ .

Проведенные нами исследования позволяют заключить, что повреждение синаптических мембран посредством как устранения  $\text{Ca}^{+2}$  и  $\text{Mg}^{+2}$  из среды инкубации, так и замораживанием—оттаиванием синаптонейросом приводит к увеличению базального входа  $^{36}\text{Cl}^-$  в синаптонейросомы. Это свидетельствует о повышении неспецифической проницаемости, которое наблюдается при нарушении целостности мембраны, например образование мембранных пор [6, 7]. Кроме того, наблюдается уменьшение мусцимол-стимулируемого входа  $^{36}\text{Cl}^-$  в синаптонейросомы в не только этих условиях, но и в отсутствие одного из катионов — либо  $\text{Ca}^{+2}$ , либо  $\text{Mg}^{+2}$ , когда неспецифическая проницаемость не изменяется. То есть, повреждение синаптических мембран приводит к снижению функциональной активности ГАМК<sub>A</sub>-РК. Возможными причинами снижения функциональной активности ГАМК<sub>A</sub>-РК могут быть нарушение структуры синаптической мембраны, например изменение ее текучести [10]. Повышение неспецифической проницаемости мембраны вследствие образования липидных пор приводит к изменению трансмембранных градиентов ионов, прежде всего аниона хлора [8], что также способствует снижению функциональной активности ГАМК<sub>A</sub>-РК.

Таким образом, можно сделать вывод, что повреждение нейрональных мембран в эпилептическом очаге будет приводить к уменьшению функциональной активности ГАМК<sub>A</sub>-РК, т.е. к снижению торможения. Это, в свою очередь, будет способствовать дальнейшей гиперактивации нейронов с последующим усилением процессов, повреждающих синаптические мембраны.

## Список литературы

1. Антонов В.Ф., Аюсов А.А., Норик В.П. и др. Мягкая порация плоских бислойных липидных мембран из дипальмитоилфосфатидилхолина при температуре фазового перехода из жидкокристаллического состояния в гель // Биофизика. — 2005. — Т. 50 (5). — С. 867-877.
2. Ребров И.Г., Карпова М.Н., Андреев А.А. и др. Cl<sup>-</sup>-проводимость ГАМК<sub>A</sub>-рецепторного комплекса синаптических мембран коры головного мозга крыс на средней стадии развития хронической эпилептизации мозга (фармакологического киндлинга) // Бюлл. Экспер. Биол. и мед. — 2007. — Т. 143, №11. — С. 507-509.
3. Ребров И.Г., Карпова М.Н., Андреев А.А. и др. Cl<sup>-</sup>-проводимость ГАМК<sub>A</sub>-рецепторного комплекса синаптических мембран коры головного мозга крыс после развития хронической эпилептизации мозга (фармакологического киндлинга) // Бюлл. Экспер. Биол. и мед. — 2008. — Т. 145, — №3. — С. 255-258.
4. Семенова С.Б., Ю.А. Эндогенные катион-транспортирующие каналы в клетках миелоидной лейкемии человека // Биологические мембраны. — 2006. — Т. 23, №4. — С. 321-329.
5. Гвозденко Т.А. Возрастные аспекты состояния пероксидации липидов и антиоксидантной защиты при действии аллоксана // Бюлл. Экспер. Биол. и мед. — 2005. — Т. 139, №3. — С. 283-287.
6. Agre P. The Aquaporin Water Channels // Proc. Am. Thorac. Soc. — 2006. — Vol. 3(1). — P. 5-13.
7. Alex E., Peter W. Membrane lysis during biological membrane fusion: collateral damage by misregulated fusion machines // J. Cell. Biol. — 2008. — Vol. 183(2). — P. 167-188.
8. Cesetti T., Ciccolini F., Li Y. GABA Not Only a Neurotransmitter: Osmotic Regulation by GABA<sub>A</sub>R Signaling // Front. Cell. Neurosci. — 2012. — Vol. 6. — P. 3.
9. Hollingsworth E.B., McNeal E.T., Burton J.L. et al. Biochemical characterization of a filtered synaptoneurososome preparation from guinea pig cerebral cortex: cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-generating systems, receptors, and enzymes // J. Neurosci. — 1985. — Vol. 5. — P. 2240-2253.
10. Kaplan P.W. The EEG of status epilepticus // J. Clin. Neurophysiol. — 2006. — 23. — P. 221-229.
11. Sato A., Takagi K., Kano K. et al. Ca<sup>2+</sup> stabilizes the semiquinone radical of pyrroloquinoline quinone // Biochem. J. — 2001. — Vol. 357(3). — P. 893-898.

Поступила 13.06.12

## Сведения об авторах:

Ребров Игорь Григорьевич, канд. биол. наук, вед. научн. сотр. лаб. эпилептогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН



В.П. Куликов, Д.В. Кузнецова

## Реакция мозгового кровотока и системного артериального давления на гиперкапнию и гипокапнию у людей

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования  
«Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.  
Россия, 656038, Барнаул, пр. Ленина, 40

У 11 здоровых добровольцев в возрасте  $21 \pm 3,7$  года мониторировали мозговой кровоток (МК) методом транскраниальной доплерографии (ТКДГ) из средних мозговых артерий и среднее гемодинамическое артериальное давление (срАД) методом непрерывного неинвазивного измерения «от сокращения к сокращению» при нормокапнии, гиперкапнии и гипокапнии. Гиперкапнию создавали методом возвратного дыхания, гипокапнию — методом спонтанной гипервентиляции. Парциальное давление  $\text{CO}_2$  в альвеолярном воздухе ( $\text{PetCO}_2$ ) мониторировали с помощью капнографа, встроенного в ТКДГ-анализатор. При гиперкапнии скорость МК и  $\text{PetCO}_2$  значительно возрастали уже на 10 с, что было существенно раньше, чем возрастание срАД (30 с). При гипокапнии скорость МК и  $\text{PetCO}_2$  значительно снижались так же на 10 с, а срАД не изменялось. Был установлен порог  $\text{PetCO}_2$  42 (41; 44) мм рт.ст., до достижения которого усиление МК происходит при постоянном срАД и характеризует истинную цереброваскулярную реактивность на  $\text{CO}_2$ .

**Ключевые слова:** мозговой кровоток, артериальное давление, гиперкапния, гипокапния, цереброваскулярная реактивность на  $\text{CO}_2$

V.P. Kulikov, D.V. Kuznetsova

## The response of cerebral blood flow and systemic arterial blood pressure to hypercapnia and hypocapnia in humans

Altay State Medical University, 40, Lenina str., Barnaul, 656038, Russia

In 11 healthy volunteers  $21 \pm 3,7$  years old was monitored cerebral blood flow (CBF) by transcranial Doppler (TCD) of middle cerebral artery and mean hemodynamic arterial blood pressure (MAP) by continuous non-invasive measurement «beat-to-beat» at normocapnia, hypercapnia and hypocapnia. Hypercapnia was creating by rebreathing, hypocapnia was creating by spontaneous hyperventilation. The partial pressure of  $\text{CO}_2$  in alveolar air ( $\text{PetCO}_2$ ) was monitored by capnograph, embedded in the TCD-analyzer. During hypercapnia the velocity of CBF and  $\text{PetCO}_2$  were significantly increased already at 10 s, which was considerably earlier than the increase in the MAP (30 s). During hypocapnia velocity CBF and  $\text{PetCO}_2$  were significantly decreased at 10 s, and MAP was not changed. We have installed the threshold  $\text{PetCO}_2$  42 (41; 44) mm Hg, below which amplification CBF occurs at a constant MAP and reflects the true cerebrovascular reactivity to  $\text{CO}_2$ .

**Key words:** cerebral blood flow, arterial blood pressure, hypercapnia, hypocapnia, cerebrovascular  $\text{CO}_2$  reactivity

В регулировании мозгового кровотока (МК) важную роль играет напряжение углекислого газа в артериальной крови ( $\text{PaCO}_2$ ) [5]. Увеличение  $\text{PaCO}_2$  (гиперкапния) приводит к расширению мозговых артериол и прекапиллярных сфинктеров (резистивных сосудов), в то время как снижение  $\text{PaCO}_2$  (гипокапнии) приводит к их сужению с последующим снижением МК [10, 21]. Увеличение скорости мозгового кровотока при гиперкапнии характеризует цереброваскулярную реактивность на углекислый газ ( $\text{ЦВРСО}_2$ ), широко применяемую в последнее время при диагностике нарушений церебральной гемодинамики [1, 17, 18].

**Для корреспонденции:** Куликов Владимир Павлович, д-р мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России. E-mail: ratofiz@agmu.ru

В то же время, гиперкапния приводит к сужению периферических сосудов и повышению системного артериального давления (АД) через стимуляцию хеморецепторов каротидных и аортальных телец. Увеличение системного АД может вести к повышению церебрального перфузионного давления и, в соответствии с законом Пуазейля, увеличению скорости МК. В условиях изменения перфузионного давления постоянство МК обеспечивают механизмы ауторегуляции. Концепция ауторегуляции была впервые предложена Лассеном [12] и заключается в поддержании оптимального объема кровотока в условиях изменения АД путем регулирования сосудистого сопротивления [15].

Усложняет эти тонкие механизмы регулирования МК то, что в условиях гиперкапнии ауторегуляция

становится неэффективной [2, 16], и вызванное гиперкапнией увеличение системного АД может усиливать МК наряду с прямым вазодилатирующим эффектом  $\text{CO}_2$ , что затрудняет оценку истинной  $\text{ЦВРСО}_2$ .

*Цель исследования* — изучение реакции мозгового кровотока и артериального давления на изменение  $\text{PaCO}_2$  в артериальной крови и оценка возможности исследования истинной  $\text{ЦВРСО}_2$ , не зависимой от изменения системного АД.

### Методика

В исследовании приняли участие 11 некурящих и не принимающих лекарственных средств добровольцев (6 мужчин). Все испытуемые не предъявляли каких-либо жалоб со стороны дыхательной и сердечно-сосудистой системы, имели нормальное АД, женщины не принимали оральные контрацептивы. Средний возраст, рост, вес и индекс массы тела составили  $21 \pm 3,7$  года,  $1,74 \pm 0,09$  м,  $66 \pm 14,2$  кг и  $21,7 \pm 3,3$  кг/м<sup>2</sup> соответственно. Добровольцы были проинформированы о протоколе исследования и используемых приборах и дали согласие на участие в исследовании. Все испытуемые получили указание воздержаться от употребления кофеина и алкогольных напитков в течение минимум 12 ч, а также от приема пищи и выполнения какой-либо активной деятельности в течение минимум 4 ч перед исследованием.

Во время исследования испытуемые находились в положении лежа на спине с удобным валиком под головой и надетой маской. Маска была соединена посредством трубки для забора воздуха с капнометром, встроенным в комплекс мониторинга мозгового кровообращения (Ангиодин-Универсал, БИОСС, Россия). Таким образом, осуществлялась капнометрия выдыхаемого воздуха с построением капнограммы и оценкой парциального давления углекислого газа ( $\text{CO}_2$ ) в последней порции выдыхаемого воздуха ( $\text{PetCO}_2$ , мм рт.ст.).  $\text{PetCO}_2$  отличается от  $\text{PaCO}_2$  всего на 1—2 мм рт.ст. и адекватно отражает его значение [9].

Скорость мозгового кровотока оценивали путем измерения средней по времени максимальной скорости кровотока (ТАМХ, см/с) в средних мозговых артериях (СМА) с обеих сторон. Для этого использовали билатеральный транскраниальный доплерографический (ТКДГ) мониторинг (Ангиодин-Универсал, БИОСС, Россия) с 2-МГц импульсно-волновыми зондами, закрепленными в области средних темпоральных акустических окон с помощью специального головного шлема.

Среднее гемодинамическое артериальное давление (срАД) регистрировали методом пальцевой фотоплетизмографии, используя непрерывное неинвазивное измерение «от сокращения к сокращению» (СНАР Monitor 500, CNSystems, Австрия), на среднем и указательном пальце левой руки.

Все параметры регистрировали на протяжении трех этапов исследования. Первый этап — нормокапния, при этом испытуемые дышали воздухом в покое в течение пяти мин. Затем следовал этап гиперкапнической гипоксии, которая создавалась методом возвратного дыхания. Для этого к маске присоединялся дыхательный контур (дыхательный контур «Карбоник», ООО НПК «Карбоник», Россия) с установленным дополнительным объемом мертвого пространства (ДОМП) 1000 мл посредством дыхательной трубки и испытуемые дышали через него в течение 10 минут. Третий этап — гипокапния — создавался методом спонтанной гипервентиляции в течение 2 мин. Этапы гиперкапнической гипоксии и гипокапнии были разделены пятиминутным отдыхом.

Для каждого этапа исследования фиксировались параметры (ТАМХ правой СМА, ТАМХ левой СМА,  $\text{PetCO}_2$ , ср.АД) каждые 10 с. Затем ТАМХ правой и левой СМА во время гиперкапнии и гипокапнии были преобразованы в процентное изменение от среднего значения, наблюдаемого при нормокапнии (% ТАМХ лев. СМА и % ТАМХ пр. СМА).

Обработка данных проводилась с использованием пакета статистических программ Statistica 6.0. При анализе результатов рассчитывали медиану (Me) и 25 и 75 процентиля. Достоверность различий средних значений определялась с помощью непараметрического критерия Уилкоксона. Для выявления взаимосвязи между показателями использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для всех тестов статистически достоверными считались различия, уровень значимости которых отвечал условию  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Все испытуемые завершили этапы нормо-, гипер- и гипокапнии. У одного добровольца запись ТАМХ из СМА была получена только с одной стороны из-за плохого акустического окна.

За период нормокапнии были найдены средние величины ( $M \pm SD$ )  $\text{PetCO}_2$ , срАД, ТАМХ левой и правой СМА для каждого испытуемого. Далее вычислены средние значения (Me (25; 75%)) для всей выборки. Среднее  $\text{PetCO}_2$  составило 33 (31,6; 35,1) мм рт.ст., что несколько меньше классических представлений о нормокапнии (35—45 мм рт.ст.). Это можно объяснить особенностями дыхания современных людей: в настоящее время обнаружено увеличение минного объема дыхания «здоровых» людей [4, 19]. Среднее АД составило 93,4 (84,4; 96,3) мм рт.ст. и соответствовало нормальным значениям. Средние ТАМХ левой и правой СМА также находились в пределах возрастной нормы и составляли 66,8 (56,8; 71,3) и 67,2 (59,1; 74,2) см/с соответственно.

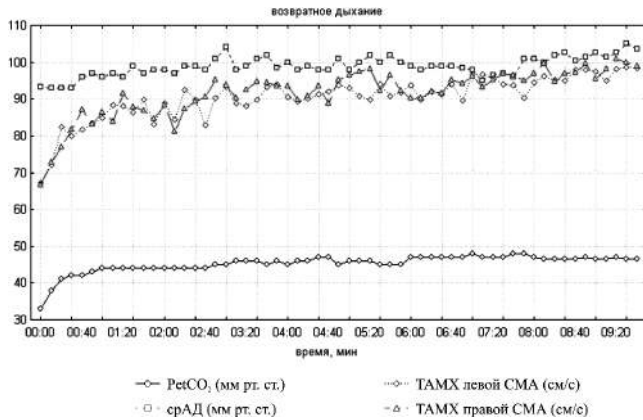


Рис. 1. Динамика PetCO<sub>2</sub>, скорости МК и среднего АД при гиперкапнии в сравнении с нормакапнией (00:00 мин)

При возвратном дыхании PetCO<sub>2</sub> значительно повышалось по сравнению с нормакапнией в первые 10 с ( $p < 0,01$ ) и продолжало резко увеличиваться до 60-й секунды. Затем находилось в состоянии плато с незначительными колебаниями (рис. 1). Максимальный прирост по отношению к нормакапнии составил 43,4% в конце этапа возвратного дыхания.

Скорость МК слева и справа при гиперкапнии также значительно увеличивалась по отношению к нормакапнии в первые 10 с ( $p < 0,01$ ), прирост PetCO<sub>2</sub> в тот момент составил 5,2 (3,7; 6) мм рт.ст. Скорость МК продолжала резко увеличиваться до прироста практически в 40% (до 60-й с) с обеих сторон, затем оставалась относительно постоянной (рис. 1). Максимальный прирост скорости МК слева и справа составил 42,3 и 49,4% соответственно в конце этапа гиперкапнии.

Среднее АД при возвратном дыхании увеличивалось значительно на 30-й с ( $p < 0,05$ ), прирост PetCO<sub>2</sub> в тот момент составил 8,7 (7,3; 10,9) мм рт.ст., его абсолютное значение — 42 (41; 44) мм рт.ст. (рис. 2). Максимальный прирост срАД составил 12,4% в середине этапа возвратного дыхания (рис. 1).

При спонтанной гипервентиляции PetCO<sub>2</sub> значительно снижалось (на 4,1 (3,5; 5,7) мм рт.ст.) в первые 10 с ( $p < 0,01$ ), максимальное снижение составляло 42,8% в конце этапа гипервентиляции (рис. 3). Скорость в СМА справа и слева также снижалась значительно ( $p < 0,01$  и  $p < 0,05$  соответственно) в первые 10 с. Таким образом, снижение PetCO<sub>2</sub> уже на 4,1 (3,5; 5,7) мм рт.ст. ведет к снижению скорости МК. МК продолжал резко снижаться в течение 20—30 с (до 30% от исходного при нормакапнии с обеих сторон), затем медленно понижался в течение всего этапа гипервентиляции (рис. 3). Максимальное снижение МК составило 46,9% слева и 42,3% справа. Обнаружена сильная положительная корреляция PetCO<sub>2</sub> и скорости МК слева и справа ( $r = 0,89$ ;  $p < 0,01$  и

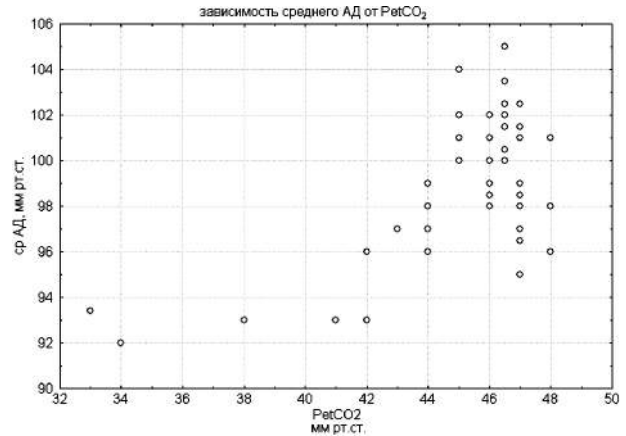


Рис. 2. Зависимость среднего гемодинамического АД от PetCO<sub>2</sub>

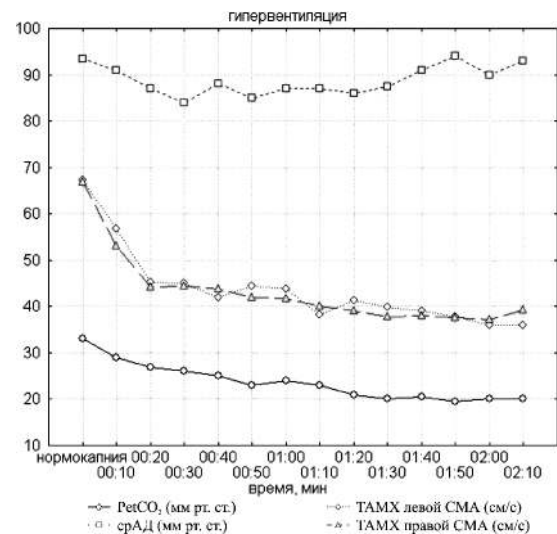


Рис. 3. Динамика PetCO<sub>2</sub>, скорости МК и среднего АД при гипокапнии в сравнении с нормакапнией (00:00 мин)

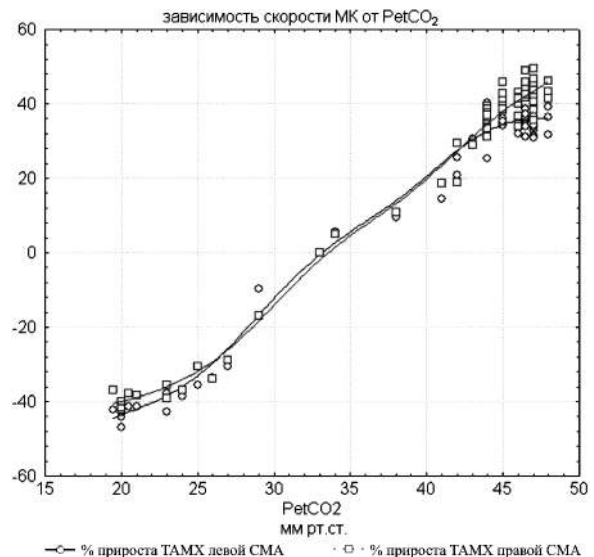


Рис. 4. Зависимость прироста скорости МК от PetCO<sub>2</sub>

$r=0,94$ ;  $p<0,01$  соответственно). СрАД при гипокапнии значимо не снижалось.

В диапазоне от гипокапнии до гиперкапнии выявлена сильная положительная корреляция  $P_{et}CO_2$  и ТАМХ левой и правой СМА ( $r=0,84$ ;  $p<0,01$  и  $r=0,81$ ;  $p<0,01$  соответственно). Обнаружена сигмоидальная связь  $P_{et}CO_2$  от гипокапнии до гиперкапнии и скорости МК (рис. 4), что сходится с результатами других авторов [6, 20]. Сигмоидальная связь может быть обусловлена ограничением диапазона скорости МК пределами изменения диаметра церебральных резистивных сосудов [3].

Гиперкапния приводит к увеличению скорости МК, гипокапния, в свою очередь, — к снижению. Реакция скорости МК на  $P_{a}CO_2$  обусловлена изменением сопротивления церебральных резистивных сосудов, механизм которого изучен не полностью. Вазодилатация при гиперкапнии возможна за счет накопления протонов водорода ( $H^+$ ) и активации  $K^+$ -каналов в сосудистых гладкомышечных клетках с дальнейшей сосудистой релаксацией [7, 11, 14]. Спорным остается вопрос о роли в усилении МК оксида азота (NO) и простагличина, выделяемых эндотелиоцитами при вазодилатации, обусловленной гиперкапнией [8, 13].

Гиперкапния также повышает срАД, что может вести к увеличению перфузионного давления на фоне срыва ауторегуляции и влиять на скорость МК. Однако для увеличения срАД необходимо более протяженное по времени возвратное дыхание, чему соответствует больший прирост  $P_{et}CO_2$ , чем для усиления скорости МК.

Таким образом, был выявлен порог  $P_{et}CO_2$  (42 (41; 44) мм рт.ст.), до достижения которого усиление МК отражает истинную  $\Delta VRCO_2$ , не зависящую от изменения системного АД, а после может быть обусловлено не только вазодилатирующим эффектом  $CO_2$ , но и увеличением перфузионного давления при росте системного АД.

### Список литературы

1. Дическул М.Л., Куликов В.П. Ультразвуковые диагностические критерии разграничения спазма и гипоплазии позвоночной артерии // Ультразвуковая и функциональная диагностика. — 2010. — №4. — С. 46-52.
2. Aaslid R., Lindegaard K.F., Sorteberg W., Nornes H. Cerebral autoregulation dynamics in humans // Stroke. — 1989. — №20. — P. 45-52.
3. Battisti-Charbonney A., Fisher J., Duffin J. The cerebrovascular response to carbon dioxide in humans // J. Physiol. — 2011. — №589(12). — P. 3039-3048.
4. Bell H.J., Feenstra W., Duffin J. The initial phase of exercise hyperpnoea in humans is depressed during a cognitive task // Experimental Physiology. — 2005. — №90(3). — P. 357-365.

5. Brian J.E. Jr., Faraci F.M., Heistad D.D. Recent insights into the regulation of cerebral circulation // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. — 1996. — №23. — P. 449-457.

6. Claassen J.A., Zhang R., Fu Q. et al. Transcranial Doppler Estimation of Cerebral Blood Flow and Cerebrovascular Conductance during Modified Rebreathing // J. Appl. Physiol. — 2007. — №102. — P. 870-877.

7. Huckstepp R.T., Dale N.  $CO_2$ -dependent opening of an inwardly rectifying  $K^+$  channel. // Pflugers. Arch. — 2011. — №461 (3). — P. 337-344.

8. Ide K., Worthley M., Anderson T., Poulin M.J. Effects of the nitric oxide synthase inhibitor L-NMMA on cerebrovascular and cardiovascular responses to hypoxia and hypercapnia in humans // J. Physiol. — 2007. — №584(1). — P. 321-332.

9. Ito S., Mardimae A., Han J. et al. Non-invasive prospective targeting of arterial  $P(CO_2)$  in subjects at rest // J. Physiol. — 2008. — №586. — P. 3675-3682.

10. Kety S.S., Schmidt C.F. The effects of altered arterial tensions of carbon dioxide and oxygen on cerebral blood flow and cerebral oxygen consumption of normal young men // J. Clin. Invest. — 1948. — №27. — P. 484-492.

11. Kitazono T., Faraci F.M., Taguchi H. et al. Role of potassium channels in cerebral blood vessels // Stroke. — 1995. — №26. — P. 1713-1723.

12. Lassen N.A. Cerebral blood flow and oxygen consumption in man // Physiol. Rev. — 1959. — №39. — P. 183-238.

13. Leffler C.W., Mirro R., Pharris L.J. et al. Permissive role of prostacyclin in cerebral vasodilation to hypercapnia in newborn pigs // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. — 1994. — №267. — H.285-291.

14. Nelson M.T., Quayle J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. — 1995. — №268. — P. 799-822.

15. Panerai R.B. Assessment of cerebral pressure autoregulation in humans — a review of measurement methods // Physiol. Meas. — 1998. — №19. — P. 305-338.

16. Panerai R.B., Deverson S.T., Mahony P. et al. Effect of  $CO_2$  on dynamic cerebral autoregulation measurement // Physiol. Meas. — 1999. — №20. — P. 265-275.

17. Reinhard M., Gerds T.A., Grabiak D. et al. Cerebral dysautoregulation and the risk of ischemic events in occlusive carotid artery disease // J. Neurol. — 2008. — №255(8). — P. 118-119.

18. Schoof J., Lubahn W., Baeumer M. et al. Impaired cerebral autoregulation distal to carotid stenosis/occlusion is associated with increased risk of stroke at cardiac surgery with cardiopulmonary bypass // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. — 2007. — №134. — P. 690-696.

19. Travers J., Dudgeon D.J., Amjadi K. et al. Mechanisms of exertional dyspnea in patients with cancer // J. Appl. Physiol. — 2008. — №104(1). — P. 57-66.

20. Ursino M., Lodi C.A. Interaction among autoregulation,  $CO_2$  reactivity, and intracranial pressure: a mathematical model // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. — 1998. — №274. — P. 1715-1728.

21. Wasserman A.J., Patterson J.L.Jr. The cerebral vascular response to reduction in arterial carbon dioxide tension // J. Clin. Invest. — 1961. — №40. — P. 1297-1303.

Поступила 27.04.12

### Сведения об авторах:

Кузнецова Дарья Владимировна, асп. каф. патофизиологии, ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России

Л.А. Кузнецова, С.А. Плесева, Т.С. Шарова, М.Н. Перцева

## **Исследование гормонореактивности аденилатциклазной сигнальной системы в эритроцитах больных диабетом 2-го типа**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, 194223, Россия, Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44

Пептиды инсулинового семейства (инсулин, инсулиноподобный фактор роста 1, релаксин), эпидермальный фактор роста (ЭФР) и биогенные амины (изопротеренол, норадреналин, адреналин и серотонин) стимулировали активность аденилатциклазы (АЦ). В мембранах эритроцитов у контрольной группы пациентов эффект гормонов потенцировался в присутствии гуанилилимидодифосфата (ГИДФ). У пациентов с начальной, средней и тяжелой стадиями сахарного диабета (СД2) базальная активность АЦ была выше, чем в контроле. При средней тяжести заболевания стимулирующий эффект биогенных аминов на АЦ без ГИДФ был сходен с контролем, но в присутствии ГИДФ потенцирование отсутствовало. При начальной и тяжелой степени СД2 чувствительность АЦ к биогенным аминам была снижена вне зависимости ГИДФ. Пептиды инсулинового семейства и ЭФР, при СД2 средней степени тяжести, стимулировали аденилат-циклазную сигнальную систему (АЦСС) аналогично контролю. В начальной и тяжелой стадии СД2 чувствительность АЦ к пептидам снижалась. В мембранах эритроцитов при диабете с СД2 имеет место нарушение функций АЦСС на уровне каталитического компонента, а при действии изученных гормонов — на уровне  $G_s$  белка и его сопряжения с АЦ.

**Ключевые слова:** эритроциты, сахарный диабет 2-го типа, аденилатциклазная сигнальная система, инсулин, инсулиноподобный фактор роста 1, релаксин, эпидермальный фактор роста, биогенные амины

L.A. Kuznetsova, S.A. Plesneva, T.C. Sharova, M.N. Pertseva

## **Study of hormone responsiveness of the adenylyl cyclase signaling system in erythrocyte membranes of patients with type 2 diabetes mellitus**

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, 44, Moris Thorez prosp., St.-Petersburg, 194223, Russia

Peptides of the insulin superfamily (insulin, insulin-like growth factor, relaxin), epidermal growth factor (EGF) and biogenic amines (isoproterenol, adrenalin, noradrenalin, serotonin) stimulate the adenylyl cyclase signaling system (ACSS). In erythrocyte membranes from a control group of patients, the hormone activating affect on ACSS was potentiated in the presence of guanylylimidinodiphosphate ( $G_{ppNHp}$ ). In erythrocyte membranes from patients of various severity of type 2 diabetes mellitus (DM2, early, medium and severe), the basal activity of AC was higher than in the control group and its responsiveness to hormones was different. It was reduced in patients with early and severe forms of DM2 both in the presence and absence of  $G_{ppNHp}$ . In patients with the medium severity of the disease, the stimulating effect of biogenic amines was not changed but there was no potentiating effect of  $G_{ppNHp}$ . The insulin superfamily peptides and EGF stimulated AC in the erythrocyte membranes of patients with the medium severity of DM2 to the same extent as in the control while, at the early and severe stages of the disease, the AC sensitivity to these hormones was significantly reduced. These data suggest that DM2 results in disturbances of the hormone stimulating properties of ACSS by insulin superfamily peptides, EGF and biogenic amines. In erythrocyte membranes, DM2 disturbs ACSS functions at the level of the catalytic component and its responsiveness to hormone action at the level of interactions between  $G_s$  and AC.

**Key words:** erythrocytes, type 2 diabetes mellitus, adenylyl cyclase signaling system, insulin, insulin-like growth factor, relaxin, epidermal growth factor, biogenic amines

Молекулярной основой СД является нарушение функции целого ряда гормональных сигнальных систем. Нами высказана гипотеза о том, что молекулярные дефекты, возникающие в гормональных сигналь-

ных системах, являются ключевыми причинами этого эндокринного заболевания [3—5]. Эта идея находит убедительные подтверждения в работах авторов, отмечавших нарушение функции эндокринной системы при развитии СД (на уровне гипоталамуса, надпочечников, гонад), мышечной, жировой ткани и др. [4, 6]. Патогенез СД до конца не выяснен. При СД 2-го типа (СД2) страдает инсулиновая система, что

Для корреспонденции: Плесева Светлана Александровна, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. ФГБУН ИЭФБ им. И.М. Сеченова РАН. E-mail: plesneva@mail.ru

связано с нарушением как функционирования рецепторов, так и систем внутриклеточной сигнализации. Одной из систем внутриклеточной регуляции действия ряда гормонов является аденилатциклазная сигнальная система (АЦСС), продуцирующая циклический АМФ (цАМФ), регулирующий многие процессы в клетке [2, 13]. При исследовании функционального состояния АЦСС при СД2, проведенные нами впервые показано, что при диабете возникают дефекты в АЦСС при действии гормонов как инсулиновой природы, так и биогенных аминов, что может свидетельствовать о полигормональном генезе СД2 [3—5]. В работе мы оценивали степень чувствительности АЦСС в мембранах эритроцитов человека к гормонам разной природы при СД2. Известно, что мембраны эритроцитов содержат аденилатциклазу (АЦ), которая стимулируется биогенными аминами и пептидами инсулинового семейства [1, 8]. Нами ранее установлено, что активирующее действие инсулина и инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР-1) на АЦ реализуется с участием целого ряда внутриклеточных компонентов. Возможная сигнальная цепь реализации стимулирующих влияний этих пептидов следующая:

Рецептор-тирозинкиназа =>  $\beta\gamma$ -димер ингибирующего ГТФ-связывающего белка ( $G_i$  белок) => фосфатидилинозитол 3-киназа => протеинкиназа  $C\zeta$  => стимулирующий ГТФ-связывающий белок ( $G_s$  белок) => АЦ [13]. Для биогенных аминов, эпидермального фактора роста (ЭФР) и релаксина сигнальная цепь иная: рецептор =>  $G_s$  белок => АЦ. Действие пептидных гормонов инсулиновой природы и ЭФР на АЦСС вовлечено в регуляцию фундаментальных процессов в клетке (метаболизм, клеточный рост, апоптоз и т.п.) [2]. ИФР-1 участвует в рост-стимулирующем эффекте и регулирует гомеостаз

глюкозы, играя важную роль в лечении СД [15]. Релаксин по регуляторным функциям близок к инсулину и влияет на репродуктивную систему с участием АЦСС [16]. ЭФР стимулирует клеточную пролиферацию с участием АЦ и цАМФ-зависимого механизма [7]. АЦСС и ее гормональная регуляция пептидами инсулинового семейства и биогенными аминами в эритроцитах человека мало исследована [5, 8, 12, 13]. В данной работе изучали СД2 (инсулиннезависимый), как наиболее распространенный тип заболевания. Накоплены данные о нарушениях передачи гормонального сигнала при СД2 и развитии инсулинорезистентности периферических тканей [10, 15].

*Цель и задачи работы:* изучение регуляции АЦСС при действии пептидов инсулинового семейства, ЭФР и биогенных аминов, а также нарушений в функционировании гормоночувствительной АЦСС в мембранах эритроцитов при СД2 различной степени выраженности.

### Методика

Исследованы следующие группы лиц: контроль (n=36) без выраженной патологии и группы пациентов с СД2 разной степени тяжести. Больные СД2 были разделены на 3 группы, согласно диагнозу, установленному на основании клинических проявлений болезни и комплексного лабораторного обследования (табл. 1): 1-я группа (n=14) — начальная стадия; 2-я группа (n=45) — среднетяжелая стадия (в 1-й и 2-й группах с длительностью заболевания от 0,5 года до 10 лет лечение проводилось без инсулиновой терапии) и 3-я группа (n=39) — тяжелая стадия с длительностью 5—15 лет (лечение проводилось с использованием инсулиновой терапии и в комплексе с липотропными препаратами, витаминами и др.).

Таблица 1

Характеристика контрольной группы и пациентов с диабетом 2-го типа

Показатели	Норма	Начальная стадия	Среднетяжелая стадия	Тяжелая стадия
Женщины	n=22	n=14	n=24	n=23
Возраст (лет)	63,4±3,5	62,3±4,2	62,5±5,9	64,5±5,7
Вес (кг)	62,8±6,8	69,8±7,0	69,5±8,2	80,0±8,5
Рост (см)	162,0±7,1	153,8±2,5	159,3±4,7	158,3±1,4
Индекс массы тела (кг/м <sup>2</sup> )	23,7±2,6	29,5±2,4	27,3±3,0	32,5±3,9
Гликемия (ммоль/л)	4,7±0,4	7,1±1,1	5,8±1,1	6,3±0,5
Мужчины	n=12	—	n=21	n=16
Возраст (лет)	70,1±2,2	—	70,2±4,9	70,5±8,1
Вес (кг)	72,2±7,2	—	69,3±7,4	81,1±10,5
Рост (см)	170,0±10,1	—	177,2±7,1	168,5±3,6
Индекс массы тела (кг/м <sup>2</sup> )	24,8±0,6	—	22,2±2,5	32,2±3,9
Гликемия (ммоль/л)	4,8±0,1	—	8,8±1,7	8,4±2,2

Влияние *in vitro* негормональных агентов на активность АЦ в мембранах эритроцитов контрольной и диабетических группах

Добавки, 10 мин	Активность АЦ (пкмоль цАМФ/мг белка/мин)			
	Контрольная группа, n=34	Начальная стадия СД2, n=14	Среднетяжелая стадия, n=45	Тяжелая стадия, n=39
Базальная АЦ	12,90±1,44	18,51±1,55	31,62±1,62	21,54±2,98
Форсколин, 10 <sup>-5</sup> М	27,42±2,11* (+112)	25,61±1,90 (+38)	40,72±3,17* (+29)	26,81±0,97 (+25)
NaF, 10 <sup>-3</sup> М	43,90±1,78* (+240)	32,53±2,32 (+76)	43,34±1,65* (+37)	32,11±2,68 (+49)
ГИДФ, 10 <sup>-6</sup> М	25,52±1,46* (+98)	24,70±1,85 (+34)	42,51±2,33 (+34)	27,93±1,95 (+30)

Примечание. Цифры в скобках — стимулирующий АЦ эффект негормональных агентов (% изменение базальной активности в контроле и при СД2); \* — достоверный стимулирующий эффект агентов (p<0,05).

Эритроциты выделяли методом центрифугирования (20 мин при 4°С, 4500 об./мин) в одноступенчатом градиенте (фиколл-урографин). Осадок эритроцитов промывали (3—7 раз), гомогенизировали и центрифугировали (20 000 g 10 мин) для получения мембранной фракции, которую использовали для определения активности АЦ.

Для выявления функций отдельных компонентов АЦСС (рецептор, G белок, АЦ) изучали *in vitro* влияние негормональных и гормональных агентов. Для оценки каталитической функции АЦ использовали активатор форсколин. Для оценки функционирования G белков: гуанилилмидодифосфат (ГИДФ) и фторид натрия (NaF). Для характеристики рецепторной функции гормонрегулируемой АЦСС использо-

вали пептиды (10<sup>-8</sup> М): инсулин, ИФР-1, релаксин, ЭФР и биогенные амины (10<sup>-6</sup> М): изопротеренол, норадреналин, адреналин и серотонин.

Определяли активность аденилатциклазы согласно методу [12]. Состав реакционной смеси была следующего состава (конечный объем 50 мкл, мМ): 25 трис-НСl (рН 7.5), 5 MgCl<sub>2</sub>, 0,1 АТФ, 1 цАМФ, 20 креатинфосфата, 1 мкКи [α-<sup>32</sup>P]АТФ, 0,2 мкг/мл креатинфосфокиназы, и 15—20 мкг мембранного белка. Инкубацию проводили при 37°С в течение 3 мин для пептидов или 10 мин для биогенных аминов. Активность фермента оценивали по количеству образовавшегося цАМФ и выражали в пикомолях цАМФ/мг белка/мин. Каждый эксперимент выполнен 2 раза в 4 параллельных пробах.

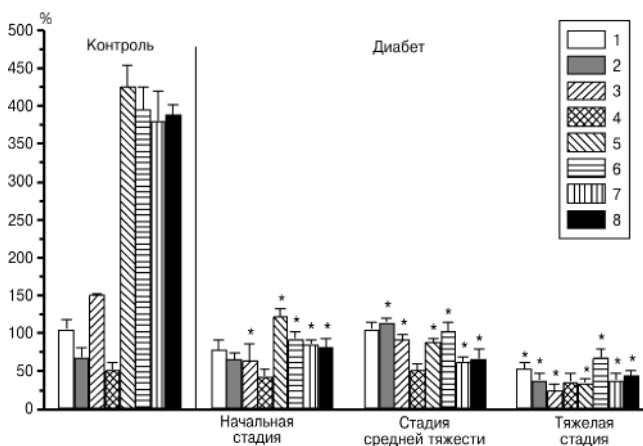


Рис. 1. Влияние *in vitro* биогенных аминов без ГИДФ и в его присутствии на активность аденилатциклазы в мембранах эритроцитов контрольной и диабетических групп: по вертикали: стимулирующий эффект биогенных аминов на активность АЦ в контроле и при СД2 (%); по горизонтали: биогенные амины (10<sup>-6</sup> М) и ГИДФ (10<sup>-6</sup> М): 1 — изопротеренол; 2 — серотонин; 3 — норадреналин; 4 — адреналин; 5 — изопротеренол + ГИДФ; 6 — серотонин + ГИДФ; 7 — норадреналин + ГИДФ; 8 — адреналин + ГИДФ; \* — достоверное отличие (p<0,05) активности аденилатциклазы при СД2 от контрольных величин.

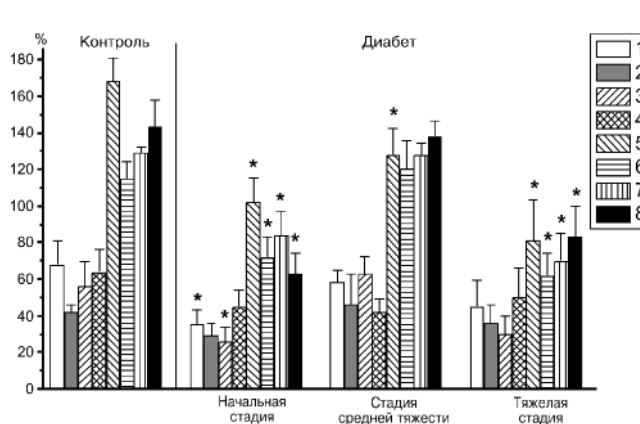


Рис. 2. Влияние *in vitro* пептидов инсулинового семейства и эпидермального фактора роста в отсутствии и в присутствии ГИДФ на активность аденилатциклазы в мембранах эритроцитов контрольной и диабетических групп: по вертикали: Стимулирующий эффект пептидов на активность АЦ в контроле и при СД2 (%). По горизонтали: пептиды (10<sup>-8</sup> М) и ГИДФ (10<sup>-6</sup> М): 1 — инсулин; 2 — ИФР-1; 3 — релаксин; 4 — ЭФР; 5 — инсулин + ГИДФ; 6 — ИФР-1+ГИДФ; 7 — релаксин + ГИДФ; 8 — ЭФР + ГИДФ; \* — достоверное отличие активности аденилатциклазы при СД2 от контрольных величин (p<0,05).

В работе использованы: креатинфосфат, креатинфосфокиназа (3500 Ед/мг белка), ГИДФ, форсколин, трис-НСl, имидазол, окись алюминия, АТФ, цАМФ, НАДФ, изопротеренол, норадреналин, адреналин, серотонин, кристаллический инсулин человека (24 IU), ИФР-1 и ЭФР («Sigma», США), [ $\alpha$ - $^{32}$ P]АТФ (4 Ки/ммоль) («ООО Изотоп», Россия). Кристаллический релаксин человека 2 любезно предоставлен доктором Д. Вайдом (Австралия). Содержание белка определяли методом Лоури. Все данные статистически обработаны (программа ANOVA) и считались достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Исследование АЦСС мембран эритроцитов контрольной группы показало, что негормональные агенты — форсколин, NaF и ГИДФ (табл. 2), а также биогенные амины и пептиды — инсулин, ИФР-1, релаксин и ЭФР (рис. 1, 2) оказывали стимулирующее влияние на активность АЦ. В присутствии ГИДФ при действии гормонов стимуляция АЦ и АЦСС усиливалась, что свидетельствует о полноценном взаимодействии всех компонентов АЦСС — рецепторного, ГТФ-связывающего, каталитического. Представленные данные сходны с результатами, полученными ранее нами и другими авторами [5, 8, 12, 13].

При СД2 базальная активность АЦ возрастала во всех изученных группах больных (табл. 2 и рис. 1, 2), что может быть связано как с развитием гипергликемии, так и с возможным изменением набора изоформ АЦ при диабете. Это может приводить к повышению каталитической способности фермента, что показали и другие авторы [9, 14]. Активность АЦ в присутствии ГИДФ не изменялась при СД2 средней тяжести и снижалась при других формах патологии (табл. 2). Стимулирующие эффекты NaF и форсколина ослаблялись при СД2 (табл. 2). При СД2 средней тяжести биогенные амины стимулировали активность АЦ сходно с контрольными величинами, ГИДФ не потенцировал влияние биогенных аминов. В начальной стадии болезни чувствительность к норадреналину снижалась, в то же время стимуляция АЦСС другими биогенными аминами не изменялась. При тяжелой стадии СД2 обнаруживалось выраженное снижение чувствительности АЦ к биогенным аминам как без ГИДФ, так и в его присутствии (рис. 1). Отчетливое снижение стимуляции АЦ, по сравнению с контрольной группой, выявленное при действии биогенных аминов у исследованных больных может свидетельствовать о нарушении сопряжения компонентов АЦ системы (рис. 1).

При СД2 средней тяжести пептиды инсулинового семейства и ЭФР стимулировали АЦСС также, как в контроле. В начальной и тяжелой стадии СД2 чувствительность к пептидам имела тенденцию к снижению

(рис. 2). Достоверное уменьшение стимуляции АЦСС при действии пептидов в присутствии ГИДФ свидетельствует об ослаблении сопряжения компонентов системы, вероятно, при взаимодействии  $G_s$  белка с АЦ. Эти предположения подкрепляют данные о снижении стимулирующего влияния NaF и ГИДФ на активность АЦ. Представленные данные свидетельствуют о снижении чувствительности АЦСС к пептидами инсулинового ряда и биогенным аминам при СД2 в начальной и тяжелой стадиях болезни. Лечение больных СД2 инсулином, не вызывало существенного улучшения чувствительности АЦ к гормонам. При среднетяжелой стадии СД2 АЦ-стимулирующее влияние пептидов было сходно с величинами, обнаруженными в контроле, в то же время при действии биогенных аминов в присутствии ГИДФ — ослаблялось. Сделан вывод о том, что СД2 ведет к ряду нарушений в функционировании АЦСС как на уровне каталитического компонента, так и при действии изученных гормонов на уровне  $G_s$  белка и его сопряжения с АЦ. Изменения функций АЦСС при диабете обнаружены и другими авторами [11]. В исследованиях с использованием генетических моделей СД2 были выявлены нарушения функций рецепторов инсулина и ИФР-1, обеспечивающих в нормальных условиях стимуляцию поглощения глюкозы мышцами [15]. Дефекты в этих рецепторных системах и, как следствие, сопряженных с ними сигнальных путях, сопровождалась развитием резистентности к инсулину при СД2 [15]. Данные о снижении тирозинкиназной активности рецептора инсулина играют существенную роль в возникновении резистентности к инсулину [10]. Однако возможны нарушения регуляции гормонами АЦСС на пострецепторных этапах передачи гормональных сигналов. Так, обнаружено ослабление стимулирующего действия инсулина на фосфатидилинозитол(3) киназу и протеинкиназу  $C\zeta$  у крыс со стрептозотоциновым СД2 и у человека с СД2 [6, 10]. При СД2, были выявлены нарушения функций как стимулирующих, так и ингибирующих G-белков, взаимодействующих с АЦ [5]. Полученные в настоящей работе данные выявили молекулярные нарушения в АЦСС действия пептидов инсулиновой природы и биогенных аминов при СД2 в эритроцитах человека, а также их восстановление с помощью лечения средне-тяжелой стадии заболевания СД2.

*Авторы благодарят врача-эндокринолога Клинической больницы РАН канд. мед. наук Манову Е.А., за подбор больных и помощь в получении экспериментального материала, а также сотрудников лаборатории Чистякову О.В. и Шпакова А.О. за помощь в эксперименте и её оформлении работы.*

*Работа поддержана РФФИ (10-04-01052) и Программой президиума РАН «Фундаментальные науки — медицина», 2011 г.*



## Список литературы

1. **Кузнецова Л.А.** Регуляторные свойства изоформ аденилатциклаз // Журн. эвол. биохим. физиол. — 2002. — 38. — С. 289-304.
2. **Перцева М.Н.** Гипотеза о ключевой координирующей роли аденилатциклазного сигнального механизма и цАМФ в регуляторном действии пептидов инсулинового суперсемейства на фундаментальные клеточные процессы: клеточный рост, апоптоз, метаболизм // Журн. эвол. биохим. физиол. — 2000. — 36. — С. 494-503.
3. **Перцева М.Н., Шпаков А.О.** Концепция молекулярных дефектов в гормональных сигнальных системах как причин эндокринных заболеваний // Рос. Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. — 2004. — 90:8. — С. 446.
4. **Перцева М.Н., Шпаков А.О.** Гипотеза эволюционного происхождения ряда болезней человека и животных // Журн. эвол. биохим. физиол. — 2010. — 46:3. — С. 261-267.
5. **Шпаков А.О., Кузнецова Л.А., Плеснева С.А.** и др. Идентификация нарушений в гормоночувствительной аденилатциклазной сигнальной системе в тканях крыс с диабетом 2 типа, используя функциональные тесты и синтетические нанопептиды // Техн. живых систем. — 2007. — 4. — С. 96-108.
6. **Bouzakri K., Roques M., Gual P.** et al. Reduced activation of phosphatidylinositol-3kinase and increased serine 636 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle from patients with type 2 diabetes // Diabetes. — 2003. — 52(6). — P. 1319-1325.
7. **Chaturvedi D., Edwin F., Sun H., Patel T.B.** Analysis of EGF receptor interactions with alpha subunit of the stimulatory GTP binding protein of adenyl cyclase // Gs. Methods Mol. Biol. — 2006. — 327. — P. 49-59.
8. **Horga J.F., Gisbert J., De Agustin J.C.** et al. A beta-2-adrenergic receptor activates adenylate cyclase in human erythrocyte membranes at physiological calcium plasma concentrations // Blood Cells Mol. Dis. — 2000. — 26:3. — P. 223-228.
9. **Kawabe J., Aizawa Y., Takehara N.** et al. Glucose modifies the cross-talk between insulin and the beta-adrenergic signaling system in vascular smooth muscle cells // J. Hypertens. — 2000. — 18. — P. 1457-1464.
10. **Le Roith D., Accili D.** Mechanisms of disease: using genetically altered mice to study concepts of type 2 diabetes // Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab. — 2008. — 4:3. — P. 164-172.
11. **Matsumoto T., Wakabayashi K., Kobayashi T., Kamata K.** Functional changes in adenyl cyclases and associated decreases in relaxation responses in mesenteric arteries from diabetic rats // Am. J. Physiol. — 2005. — 289:5. — H2234-43.
12. **Pertseva M.N., Plesneva S.A., Shpakov A.O.** et al. Involvement of adenyl cyclase signalling system in the action of insulin and mollusc insulin-like peptide // Comp. Biochem. Physiol. — 1995. — 112. — P. 689-695.
13. **Pertseva M.N., Shpakov A.O., Plesneva S.A., Kuznetsova L.A.** A novel view on the mechanism of action of insulin and other insulin superfamily peptides: involvement of adenyl cyclase signaling system // Comp. Biochem. Physiol. — 2003. — 134. — P. 11-34.
14. **Portela-Gomez G.M., Grimelius L., Johansson H.** et al. Increased expression of adenyl cyclase isoforms in the adrenal gland of diabetic Goto-Kakizaki rat // Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. — 2002. — 10:4. — P. 387-392.
15. **Ranke M.B.** Insulin-like growth factor-I treatment of growth disorders, diabetes mellitus and insulin resistance // Trends Endocrinol Metab. — 2005. — 16:4. — P. 190-197.
16. **Sherwood O.D.** Relaxin's physiological roles and other diverse actions // Endocrine Reviews. — 2004. — 25:2. — P. 205-234.

Поступила 21.09.11

## Сведения об авторах:

*Кузнецова Людмила Александровна*, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. ФГБУН ИЭФБ им. И.М. Сеченова РАН  
*Шарова Татьяна Сергеевна*, мл. науч. сотр., ФГБУН ИЭФБ им. И.М. Сеченова РАН  
*Перцева Марианна Николаевна*, д-р биол. наук, проф., гл. науч. сотр., ФГБУН ИЭФБ им. И.М. Сеченова РАН

А.Ю. Цибулевский<sup>1</sup>, Т.К. Дубовая<sup>1</sup>, А.Г. Максина<sup>1</sup>, Б.З. Соколинский<sup>2</sup>,  
А.М. Пятницкий<sup>1</sup>, В.С. Медовый<sup>2</sup>, В.Е. Анисимова<sup>1</sup>

## **Морфо-биофизическое исследование эритроцитов интактных и ваготомированных крыс в различные сроки после острой кровопотери**

<sup>1</sup> Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

<sup>2</sup> ЗАО Медицинские компьютерные системы (Мекос), 117437, Москва, ул. Академика Волгина, 33

*Острая массивная кровопотеря (35—37% от общего объема крови) у крыс сопровождается закономерными изменениями морфологических (диаметр, площадь, поляризации, фактор формы, интегральная и удельная оптическая плотность) и биофизических (микровязкость липидной фазы плазмолеммы и рельеф ее поверхности) характеристик эритроцитов. При этом характер и динамика ответной реакции эритрона исходно интактных и ваготомированных (через 14 сут. после операции) животных существенно различаются: у первых наиболее выраженные изменения отмечаются через 3—10 и 240 ч, в то время как у вторых — через 0,5—3 и 96 ч.*

**Ключевые слова:** кровопотеря, ваготомия, эритроциты, морфология, микровязкость мембраны

A.Yu. Tsibulevsky<sup>1</sup>, T.K. Dubovaya<sup>1</sup>, A.G. Maksina<sup>1</sup>,  
B.Z. Sokolinsky<sup>2</sup>, A.M. Pyatnitsky<sup>1</sup>, V.S. Medovy<sup>2</sup>, V.E. Anisimova<sup>1</sup>

## **Morpho-biophysical research of erythrocytes of intact and vagotomized rats in various terms after the acute hemorrhage**

<sup>1</sup> Russian national research medical university, 117997, Moscow, Ostrovityanov str., 1

<sup>2</sup> Medical computer systems (Mekos), 117437, Academician Volgin str., 33

*The acute massive hemorrhage (35—37% of the blood volume) at rats is accompanied by changes of morphological (diameter, the area, polarizations, the form-factor, integrated and specific absorbency) and biophysical (a relief of a surface and microviscosity of a lipid phase of plasmolemma) characteristics of erythrocytes. Thus character and dynamics of response of erythron initially intact and vagotomized (14 days after operation) animals essentially differ: the former demonstrate significant changes in 3—10 h and 240 h and the latter — in 0,5 h and 96 h.*

**Key words:** hemorrhage, vagotomy, erythrocytes, morphology, membrane microviscosity

Острая массивная кровопотеря является одним из наиболее распространенных патологических состояний [4]. Некоторые ее аспекты требуют дальнейших исследований, в частности, состояние эритроцитов после кровопотери в условиях нарушения иннервации органов брюшной полости. Это обусловлено тем, что ваготомия используется как компонент оперативного вмешательства при хирургическом лечении перфоративных кровоточащих язв 12-перстной кишки [25]. Исходя из ведущей роли гипоксии в патогенезе постгеморрагического синдрома [21], в настоящей работе предпринята попытка изучения состояния эритроцитов у интактных и ваготомированных крыс в динамике после массивной кровопотери.

**Для корреспонденции:** Цибулевский Александр Юрьевич, д-р мед. наук., проф. каф. гистологии и эмбриологии лечебного факультета ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. E-mail: auts77@gmail.com

### **Методика**

Эксперименты проводили на 75 беспородных крысах-самцах массой 200—250 г. Исследовали 4 группы животных: 1-я — интактные; 2-я — животные через 14 сут. после двусторонней поддиафрагмальной стволовой ваготомии; 3-я и 4-я соответственно интактные и денервированные крысы, перенесшие кровопотерю. Кровопускание производили из яремной вены в размере 35—37% от общего объема крови. Материал для исследования брали через 0,25; 0,5; 3; 10; 24; 96 и 240 ч (10 сут.) после кровопотери. На неокрашенных мазках крови, фиксированных в парах формальдегида, с помощью компьютерной морфоденситометрии (на комплексе автоматизированной микроскопии МЕКОС-Ц2) определяли диаметр, площадь, интегральную и удельную оптическую плотность (показатель, косвенно отражающий насы-

ценность эритроцитов гемоглобином), поляризацию, фактор формы эритроцитов, значения анизоцитоза и анизохромии, процентное содержание эхиноцитов и стоматоцитов. Для обобщенной характеристики морфологических изменений эритроцитов с учетом всей совокупности изученных параметров рассчитывали комплексный интегральный показатель [5]. С помощью метода спигового зонда исследовали микровязкость липидного бислоя и рельеф поверхности эритроцитарной мембраны (через 24 ч после кровопотери). Для этого суспензию эритроцитов инкубировали с одним из трех зондов: спин-мечеными аналогами стеариновой кислоты с нитроксильным фрагментом у пятого (зонд 1) или четырнадцатого (зонд 2) углеродного атома ацильной цепи и спин-меченым бензокарболином (зонд 3). Существенно, что зонды 1 и 2 встраиваются в липидный бислой таким образом, что карбоксильная группа находится на его поверхности, а жирнокислотная цепь погружена в бислой параллельно ацильным цепям фосфолипидов. При этом радиальные фрагменты зондов располагаются на разной глубине (0,6—0,8 и 2,0—2,2 нм соответственно). Зонд 3 локализуется в области периферических белков плазмолеммы. По кинетике восстановления его сигнала феррицианидом калия судили о рельефе поверхности эритроцитов. Показателем скорости тушения зонда является тангенс угла наклона кинетической прямой по отношению к горизонтальной оси ( $\text{tg } \alpha$ ). Чем больше  $\text{tg } \alpha$ , тем быстрее происходит тушение сигнала (тем доступнее зонд) и, следовательно, более рыхлым является гликокаликс плазматической мембраны эритроцита. Для характеристики поведения спиговых зондов в мембране использовали

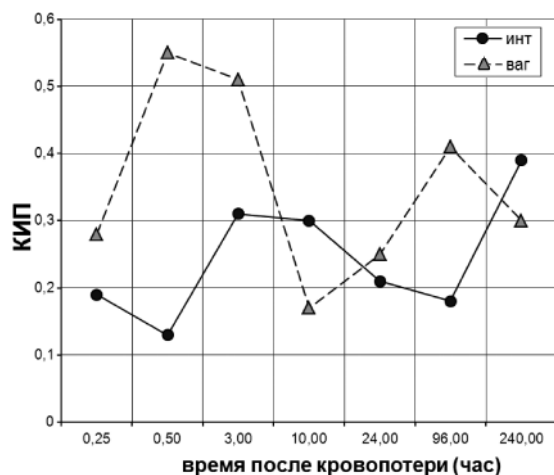


Рис. 1. Изменения комплексного интегрального показателя морфологии эритроцитов исходно интактных и ваготомированных крыс в различные сроки после кровопотери:

КИП — комплексный интегральный показатель;  
ИНТ — интактные крысы;  
ВАГ — ваготомированные крысы

параметр упорядоченности, рассчитываемый по спектрам электронного магнитного резонанса и характеризующий подвижность ацильных цепей в области локализации нитроксильного фрагмента зонда. При этом параметр  $S_1$  характеризует упорядоченность мембраны на глубине 0,6—0,8 нм от поверхности, параметр  $S_2$  — на глубине 2,0—2,2 нм. Полученные данные подвергали статистической обработке по методу Фишера—Стьюдента [10].

### Результаты и обсуждение

Массивная кровопотеря у исходно интактных крыс сопровождается достоверным увеличением среднего диаметра, площади эритроцитов, поляризации и фактора формы (0,5; 3; 10; 24 и 240 ч), а также их интегральной (3, 10, 240 ч) и удельной (240 ч) оптической плотности (табл. 1). Также выявлена тенденция к увеличению удельной доли эхиноцитов (10 ч) и стоматоцитов (96 ч). Статистически значимых отклонений показателей анизоцитоза и анизохромии не обнаружено. Расчет комплексного интегрального показателя показал, что наиболее выраженные изменения морфологии эритроцитов отмечаются через 3—10 ч и 240 ч (рис. 1). В этих условиях выявлены закономерные изменения и физико-химических характеристик эритроцитов. Так, зарегистрировано уменьшение параметра упорядоченности для зондов 1 и 2, что указывает на снижение микровязкости липидной фазы по всему профилю мембраны эритроцитов (табл. 3). Анализ кинетики восстановления сигнала зонда 3 показал, что на фоне кровопотери отмечаются выраженные преобразования рельефа поверхности эритроцитов (рис. 2).

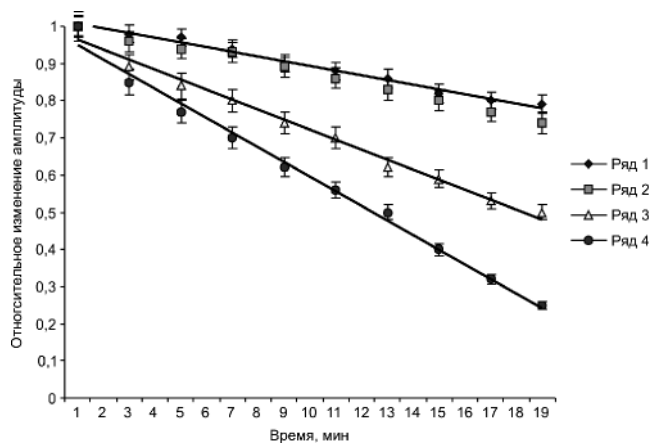


Рис. 2. Тушение амплитуды сигнала спигового зонда феррицианидом калия:

ряд 1 — интактные;  
ряд 2 — ваготомия;  
ряд 3 — ваготомия + кровопотеря;  
ряд 4 — интактные + кровопотеря

Таблица 1

## Морфологические параметры эритроцитов интактных крыс в различные сроки после кровопотери (М±m)

Сроки (ч)	0 (n=5)	0,25 (n=5)	0,5 (n=4)	3 (n=5)	10 (n=5)	24 (n=5)	96 (n=5)	240 (n=5)
Средний диаметр (мкм)	6,28±0,01	6,35±0,15	6,45±0,17*	6,55±0,08*	6,52±0,12*	6,41±0,06*	6,37±0,32	6,75±0,06*
Площадь (мкм <sup>2</sup> )	31,10±0,09	31,77±1,55	32,79±1,75*	33,85±0,87*	33,57±1,20*	32,35±0,56*	32,16±3,20	35,96±0,63*
Поляризация	0,050±0,01	0,058±0,01*	0,053±0,01	0,064±0,01*	0,064±0,01*	0,051±0,01	0,059±0,01*	0,055±0,01
Фактор формы	14,72±0,52	13,94±0,10*	14,05±0,17*	16,70±1,01*	16,39±0,60*	15,49±0,30*	14,92±0,17	15,20±0,10*
Интегральная оптическая плотность	5,84±0,18	6,40±0,91	6,28±0,77	6,52±0,56*	6,57±0,36*	5,99±0,32	6,07±0,33	7,68±0,57*
Удельная оптическая плотность	0,188±0,01	0,200±0,02	0,191±0,02	0,193±0,02	0,196±0,01	0,186±0,01	0,191±0,02	0,213±0,01*
Анизоцитоз	6,6±0,2	6,8±0,2	6,6±0,2	6,0±0,1	7,2±0,4	6,4±0,6	6,6±1,6	8,0±0,6
Анизохромия	18,4±1,3	21,4±0,2	19,4±0,6	17,2±0,4	17,2±0,4	15,4±0,6	17,0±2,4	21,0±2,0
Комплексный интегральный показатель	0	0,19	0,13	0,31	0,3	0,21	0,18	0,39

Таблица 2

## Морфологические параметры эритроцитов ваготомированных крыс в различные сроки после кровопотери (М±m)

Сроки (час)	0 (n=5)	0,25 (n=5)	0,5 (n=5)	3 (n=4)	10 (n=4)	24 (n=5)	96 (n=4)	240 (n=4)
Средний диаметр (мкм)	6,59±0,01**	6,49±0,02	5,86±0,02*	5,68±0,02	6,66±0,01	6,54±0,01	6,76±0,02	6,94±0,01*
Площадь (мкм <sup>2</sup> )	34,30±1,97**	33,24±2,74	27,25±3,80*	25,70±4,90	35,03±1,91	33,71±1,93	36,11±1,32	38,04±0,72*
Поляризация	0,051±0,01	0,062±0,01	0,053±0,01	0,056±0,01	0,052±0,01	0,053±0,01	0,061±0,01	0,047±0,01
Фактор формы	14,55±0,26	15,97±0,89*	14,68±0,24	14,59±0,21*	14,27±0,12	16,02±1,13*	16,22±0,23*	14,90±0,72
Интегральная оптическая плотность	6,64±0,59**	6,33±0,63	5,74±0,42	5,65±0,59	6,91±0,59	6,08±0,21	7,82±0,96	8,00±0,46*
Удельная оптическая плотность	0,193±0,01	0,191±0,01	0,215±0,02	0,226±0,03	0,197±0,01	0,181±0,01	0,216±0,02	0,210±0,01
Анизоцитоз	6,8±0,2	7,0±0,4	7,4±0,2	7,8±0,8	6,5±0,4	6,6±0,2	7,5±0,3	8,3±0,4
Анизохромия	20,8±1,0	17,6±1,8	14,6±0,6	17,0±0,8	18,0±0,8	17,4±0,8	16,2±0,6	21,0±1,0
Комплексный интегральный показатель	0	0,28	0,55	0,51	0,17	0,25	0,41	0,3

Таблица 3

## Биофизические параметры плазматической мембраны эритроцитов в различные сроки после кровопотери

Серии	Параметры		
	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	tg α
ИНТ	0,639±0,09	0,516±0,014	0,0105
ИНТ + кровопотеря	0,587±0,011*	0,467±0,006*	0,0394
ВАГ	0,636±0,013	0,519±0,005	0,0112
ВАГ + кровопотеря	0,614±0,003*	0,508±0,008	0,0289

Установлено, что ваготомия сопровождается увеличением среднего диаметра, площади и интегральной оптической плотности эритроцитов (табл. 2). При этом существенных изменений микровязкости липидного бислоя и рельефа поверхности эритроцитарной мембраны не выявлено.

Динамика морфологических показателей эритроцитов у денервированных животных в условиях кровопотери характеризуется рядом особенностей по сравнению с таковой у интактных крыс. Так, средний диаметр и площадь эритроцитов через 0,5 ч достоверно уменьшаются, в то время как у интактных — увеличиваются. Аналогичным образом изменяются показатели поляризации (через 3 и 10 ч) и фактор формы (0,5 и 10 ч) эритроцитов. В отличие от интактных крыс кровопотеря у ваготомированных животных не приводит к существенному повышению интегральной оптической плотности эритроцитов (за исключением 240 ч) (табл. 2). Перестройка качественного состава популяции эритроцитов денервированных крыс при этом также имеет определенные особенности: через 0,5 ч отмечается тенденция к увеличению содержания стоматоцитов, а через 10 ч — эхиноцитов. Наибольшие отклонения комплексного интегрального показателя морфологии эритроцитов зарегистрированы через 0,5—3 ч и 96 ч (рис. 1). Существенных отличий в изменениях физико-химических характеристик эритроцитов в условиях острой кровопотери у ваготомированных крыс по сравнению с исходно интактными не обнаружено. Можно лишь отметить несколько меньшую степень изменений профиля поверхности плазмалеммы эритроцитов у крыс, подвергнутых ваготомии (рис. 2).

Приступая к обсуждению полученных результатов, можно предположить, что увеличение среднего диаметра и площади эритроцитов при кровопотере, по всей вероятности, обусловлено активацией эритропоэза и ускоренным поступлением из красного костного мозга в кровеносное русло ретикулоцитов, отличающихся, как известно, большими размерами по сравнению с нормоцитами [3]. При этом отмечается искажение формы эритроцитов, о чем свидетельствует нарастание значений поляризации и фактора формы. Вероятной причиной изменения геометрических характеристик эритроцитов может быть снижение микровязкости липидной фазы их плазмалеммы, на что указывает уменьшение параметра упорядоченности для зондов 1 и 2. В основе данного явления предположительно лежат нарушения химической структуры и физико-химических характеристик эритроцитарной мембраны. Так, известно, что в условиях кровопотери наблюдается активация свободнорадикального окисления липидов мембраны эритроцитов [9] и перестройка липидного состава в сторону увеличения

доли кислых фосфолипидов и холестерина [7]. Определенный вклад в изменение липидного профиля мембраны эритроцитов могут также вносить липопротеиды плазмы. Считается, что в результате их взаимодействия с эритроцитарной мембраной меняется содержание холестерина и триацилглицеридов в ее липидной матрице [7]. В качестве наиболее вероятных агентов, приводящих к таким изменениям, можно считать продукты перекисного окисления липидов, биогенные амины и другие физиологически активные вещества, содержание которых в крови существенно повышается при кровопотере [12]. Высказывается мнение, что сдвиги в химическом составе липидной матрицы плазмалеммы эритроцитов и связанные с ними изменения вязкоэластических свойств этих форменных элементов можно рассматривать как неспецифическую приспособительную реакцию организма к гипоксии различной этиологии. Дело в том, что увеличение содержания кислых фосфолипидов в мембране улучшает ее проницаемость для респираторных газов, а нарастание концентрации холестерина ведет к увеличению суммарной площади поверхности, что в итоге повышает эффективность газо-транспортной функции эритроцитов [11, 16]. Также важным элементом ответной реакции системы крови на кровопотерю является увеличение содержания гемоглобина в эритроцитах. В нашем исследовании на это косвенно указывает повышение удельной оптической плотности эритроцитов. Следует иметь в виду, что развитие и исход данного патологического состояния существенно зависит от скорости элиминации «старых» и неполноценных эритроцитов [13]. Действительно, в нашей работе и в исследованиях других авторов [15] продемонстрировано увеличение доли стареющих форм (эхиноцитов, стоматоцитов и др.) при кровопотере.

Оценивая с биологических позиций выявленные дезадаптационные процессы в системе крови в условиях кровопотери, в первую очередь необходимо указать на особую роль гипоксии органов ЦНС и обусловленные ею расстройства интегративной деятельности головного мозга, а также нарушения связей между нервной, эндокринной и иммунной системами [8].

Изученная нами специфика ответной реакции эритрона на кровопотерю в условиях ваготомии предположительно может быть обусловлена несколькими причинными факторами. В частности, патологическая импульсация с центральных концов перерезанных блуждающих нервов, вызывая раздражение соответствующих ядер гипоталамуса, может нарушать функционирование находящихся поблизости нервных центров, регулирующих гемопоэз. Правомочность данного предположения косвенно подтверждается резу-

лбатами исследований, в которых производилось локальное раздражение различных ядерных структур гипоталамуса, что вызывало закономерные перестройки состояния красной крови [6]. Кроме того, следует учитывать, что по нашим данным в очаге денервации существенно увеличивается количество лаброцитов [19]. Последние, как известно, наряду с другими клетками активно продуцируют цитокины, некоторые из которых (интерлейкин-1, гамма-интерферон, фактор некроза опухолей) принимают непосредственное участие в регуляции эритропоэза [22]. Наряду с этим определенным вклад в специфику развития исследуемого состояния может вносить «желудочный» фактор. Показано, что ваготомия сопровождается существенными изменениями состояния париетальных клеток желудочных желез [23], которые продуцируют компоненты соляной кислоты и вырабатывают внутренний фактор Касла (соляная кислота необходима для эффективного усвоения железа, фактор Касла — витамина В<sub>12</sub>) [1]. В связи с этим можно предположить, что в условиях нарушения парасимпатической иннервации желудка развивается относительный дефицит железа и цианкобаламина — важных участников эритропоэза. К этому следует добавить выявленные при ваготомии расстройства обмена меди [18], также играющей определенную роль в процессе созревания эритроцитов [26]. Кроме того, ваготомия, как правило, сопровождается развитием гастростаза [17], в том числе и у крыс [2]. Вместе с тем установлено, что раздражение механорецепторов желудка приводит к существенным количественным и качественным изменениям показателей красной крови [20]. Это обстоятельство позволяет предположить, что накопление и длительный застой плотных пищевых масс в желудке ваготомированных крыс может оказать влияние на процесс эритропоэза по вышеуказанному механизму. Наряду с «желудочным» фактором в определение специфики ответа системы крови на кровопотерю в условиях ваготомии может вносить и «почечный» фактор, поскольку почки являются главным источником эритропоэтинов [24], а блуждающий нерв принимает участие в их иннервации [14].

На основании полученных результатов можно прийти к следующему заключению. Перерезка блуждающих нервов не сопровождается выраженными изменениями формы и рельефа поверхности эритроцитов, а также микровязкости липидной фазы их плазматической мембраны. Острая массивная кровопотеря приводит к существенным изменениям морфологических и физико-химических характеристик эритроцитов как у исходно интактных, так и у ваготомированных крыс. При этом динамика ответной реакции эритроцитов в данных группах животных заметно различается. Основной из главных причин выявленных

морфофункциональных изменений эритроцитов у интактных и денервированных животных на фоне кровопотери является гипоксия и ее последствия. Вместе с тем ответная реакция ваготомированных крыс на гипоксию имеет свои особенности. Последние могут быть связаны с тем, что перерезка блуждающих нервов приводит к нарушению взаимодействия интегрирующих систем (нервной, эндокринной и иммунной), а также с нарушением состояния органов, вовлеченных в очаг денервации (желудок, почки и др.) и, как следствие, нарушением гомеостаза. Полученные результаты углубляют представление о механизмах повреждения эритроцитов при различных экстремальных ситуациях, в частности, при кровопотере.

### Список литературы

1. Алиев Б.М., Аруин Л.И., Габуня Р.И. и др. Желудок // БМЭ, Т. 8, Советская энциклопедия. — М., 1978. — С. 92-141.
2. Байбеков И.М., Ворожейкин В.М., Ризаев Р.М. Изменения слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки и желудка при экспериментальных дуоденальных язвах и ваготомии // Арх. Анатомии, гистологии и эмбриологии. — 1985. — Т. 33, №6. — С. 69-72.
3. Воробьев А.И. Руководство по гематологии. — М.: Ньюдиамед, 2007. — 1275 с.
4. Елисеева И.И., Васильева Э.К., Каупт М.А. и др. Демография и статистика населения. — М.: Финансы и статистика, 2006. — 688 с.
5. Жукоцкий А.В., Якубова Н.И., Коган Э.М. Применение персональных компьютеров в морфологической диагностике методами многомерной статистики. — Караганда, 1991. — 34 с.
6. Канн Е.Л. Исследования структурно-функциональной организации процессов управления адаптивным поведением эритроцитарной части системы крови // Проблемы интерорецепции, регуляции физиологических функций и поведения. — Л.: Наука, 1976. — С. 71-91.
7. Каплан О.В. Липиды эритроцитов и газотранспортная функция крови при острой кровопотере // Вопр. мед. химии. — 1995. — №2. — С. 23-25.
8. Кожура В.Л. Нейробиологические механизмы массивной кровопотери // Анестезиол. и реаниматол. — 2001. — №6. — С. 51-53.
9. Лазарева Г.А., Паскова И.П. Изменения химического состава и физико-химических свойств эритроцитов после кровопотери // Человек и его здоровье. — Курск, 1999. — Т. 2. — С. 67-69.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 351 с.
11. Марьянских В.В. Исследование вязкоэластических свойств мембран эритроцитов беспородных белых крыс с различным уровнем двигательной активности в ответ на стрессы различной этиологии и оценка деформируемости эритроцитов людей с гипертонией: Дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — Тюмень, 2007.
12. Матвеев С.Б., Пахомова Г.В., Кифус Ф.В., Голицов П.П. Окислительный стресс при открытой абдоминальной травме с массивной кровопотерей // Клинич. лаб. диагностика. — 2005. — №1. — С. 14-16.

13. *Микашинович З.И.* Механизмы адаптивной перестройки энергетического обмена эритроцитов при острой кровопотере // Патол. физиол. и эксперим. терапия. — 1984. — №2. — С. 12-15.
14. *Пытель А.Я., Рябов С.И., Тимохов В.С.* и др. Почка // БМЭ, Т. 20. — М.: Советская энциклопедия, 1983. — С. 428-477.
15. *Радаев С.М.* Структурные и функциональные свойства эритроцитов у больных с тяжелой травмой и кровопотерей: Дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — М., 2001.
16. *Соловьев С.В.* Деформируемость эритроцитов крыс в динамике после кровопотери // Физиол. ж. СССР. — 1989. — №12. — С. 1780-1782.
17. *Хоромский Л.Н., Бенедикт В.В., Лойко И.К.* и др. Концепция функционального гастростаза после хирургического лечения язвенной болезни // Клинич. хирургия. — 1990. — №8. — С. 40-42.
18. *Цибулевский А.Ю.* К вопросу о роли вегетативной нервной системы в регуляции минерального обмена // Изв. АН СССР (Сер. Биол.). — 1981. — №4. — С. 518-525.
19. *Цибулевский А.Ю.* Закономерности нейродистрофического процесса в тонкой кишке при ваготомии: Автореф. дисс. на соискание ученой степени д.м.н. — М., 1999. — 48 с.
20. *Черниговский В.Н., Шехтер С.Ю., Ярошевский А.Я.* Регуляция эритропоэза. — Л.: Наука, 1967. — 101 с.
21. *Ярочкин В.С., Панов В.П., Максимов П.И.* Острая кровопотеря. — М.: Медицина, 2004. — 368 с.
22. *Bunn H.* New agents that stimulate erythropoiesis // Blood. — 2007. — Feb. — 109 (3). — P. 868-873.
23. *Helander H., Poorkhalkali N.* Immunohistochemical localization of gastrin/CCK-B receptors in the dog and guinea-pig stomach // Scand. J. Gastroenterol. — 2004. — Jan. — 39(1). — P. 20-26.
24. *Macdougall I.* Novel erythropoiesis-stimulating agents: a new era in anemia management // Clin. J. Am. Soc. Nephrol. — 2008. — Jan. 3(1). — P. 200-207.
25. *Palmer K.* Acute upper gastrointestinal haemorrhage // Br. Med. Bull. — 2007. — Sep. — 83. — P. 307-324.
26. *Rondanelli M., Opizzi A., Andreoni L., Trotti R.* Effect of treatment with a food supplement (containing: selected sea fish cartilage, vitamin C, vitamin E, folic acid, zinc, copper) in women with iron deficiency: double blind, randomized, placebo-controlled trial // Minerva Med. — 2006. — Oct. — 97(5). — P. 385-390.

Поступила 01.12.10

#### Сведения об авторах:

*Дубовая Татьяна Клеониковна*, д-р мед. н., проф. каф. гистологии и эмбриологии лечебного факультета ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России

*Максина Александра Генриховна*, д-р биол. наук, проф. каф. общей и медицинской физики лечебного факультета ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России

*Медовый Владимир Семенович*, д-р техн. н., ген. дир. ЗАО «Медицинские компьютерные системы (МЕКОС)»

*Пятницкий Алексей Михайлович*, канд. биол. наук, доцент каф. высшей математики медико-биологического факультета ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России;

*Соколинский Борис Залманович*, канд. биол. наук, зам. ген. дир. ЗАО «Медицинские компьютерные системы (МЕКОС)»

*Анисимова Вероника Евгеньевна*, аспирант каф. гистологии и эмбриологии лечебного факультета ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России

Д.Н. Панченков<sup>2</sup>, М.В. Баранов<sup>1</sup>, Д.А. Астахов<sup>1,2</sup>, А.А. Нечунаев<sup>2</sup>, С.Д. Леонов<sup>2</sup>, М.Е. Бехтева<sup>2</sup>

## **Биохимические аспекты влияния антиортостатической гипокинезии на течение экспериментального перитонита**

<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> Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова»

Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, 127473, Москва, ул. Делегатская, 20, стр.1

*Исследование выполнено на 80 белых беспородных крысах. Все животные разделены на 4 группы по 20 особей в каждой. 1-я группа — виварийный контроль; 2-я — антиортостатическая гипокинезия (АНОГ); 3-я — перитонит; 4-я — сочетание АНОГ + перитонит. Эффекты АНОГ достигались путем вывешивания крыс на специальном стенде на срок 14 дней с последующим формированием перитонита. Изучались биохимические показатели крови. Выявлено, что эффекты моделированной микрогравитации и перитонита носят однонаправленный характер, а их сочетание проявляется взаимным отягощением, что иллюстрирует двукратное повышение уровня некоторых показателей по сравнению с контролем и виварийным перитонитом. Таким образом моделированные эффекты микрогравитации усугубляют течение перитонита.*

**Ключевые слова:** микрогравитации, перитонит, антиортостатическая гипокинезия, биохимические изменения

D.N. Panchenkov<sup>2</sup>, M.V. Baranov<sup>1</sup>, D.A. Astakhov<sup>1,2</sup>, A.A. Nechunaev<sup>2</sup>, S.D. Leonov<sup>2</sup>, M.E. Behteva<sup>2</sup>

## **Biochemical aspects of the influence of antiorthostatic hypokinesia on the experimental peritonitis**

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

<sup>2</sup> Moscow State University of Medicine and Dentistry, 127473 Russia, Moscow, Delegatskaya str., 20/1

*Eighty white rats were divided into 4 groups: (1) vivarium control, (2) antiorthostatic hypokinesia (AH), (3) peritonitis alone, and (4) AH with peritonitis. Effects of AH were achieved by putting rats on a special stand for a period of 14 days, followed by the formation of peritonitis. After that biochemical parameters of blood samples have been investigated. Combination effects of microgravity and peritonitis is unidirectional and have mutual weights. As illustrated in some cases two-fold increase in the level of the studied parameters in comparison with the control and vivarium peritonitis. Comparative assessment of peritonitis severity revealed that simulated effects of microgravity turn the peritonitis into more complicated forms.*

**Key words:** microgravity, peritonitis, antiorthostatic hypokinesia, biochemical changes

Изучение особенностей течения заболеваний человека при моделировании эффектов невесомости обусловлено практической потребностью выработки подходов к оказанию медицинской помощи при возникновении у космонавтов острых хирургических заболеваний и критических состояний. Случаи возникновения у членов экипажей космических кораблей функциональных расстройств или заболеваний, при которых применялись лечебно-профилактические мероприятия, подтверждают такую возможность [1—5, 8, 9]. Значимость проблемы оказания медицинской помощи космонавтам в условиях космических полетов будет возрастать, особенно учитывая перспективу

межпланетных экспедиций. В частности, реализация марсианской экспедиции потребует создания надежного и эффективного комплекса медико-биологического обеспечения жизнедеятельности экипажа [4, 9]. Это особенно важно для космонавта, у которого заболевание развилось в длительном космическом полете, когда имеется уже исходный дефицит объема циркулирующей крови, снижение активности иммунной системы, и ряд других функциональных изменений вследствие длительного воздействия невесомости, что может отягощать состояние при небольшом объеме поражения [2, 8, 9]. Методические трудности проведения подобных исследований в условиях космического полета создают предпосылки для использования моделирования основных физиологических эффектов невесомости. Основными патогенетическими факторами невесомости считаются:

**Для корреспонденции:** Баранов Михаил Викторович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. физиологических проблем невесомости ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: labmicrogravity@rambler.ru



- 1) ограничение мышечной активности;
- 2) понижение или отсутствие гидростатического давления жидких сред организма, прежде всего крови;
- 3) отсутствие тонуса опоры по Радемакеру;
- 4) измененная афферентация с позно-тонической мускулатуры [1, 3—5, 8—10].

Все эти факторы в той или иной степени моделируются моделируют в условиях антиортостатической гипокинезии (АНОГ).

В качестве модели хирургического заболевания был выбран перитонит. Это вторичный патологический процесс — воспаление брюшины, осложняющий течение первичного патологического процесса, травмы или заболевания, приведшего к образованию источника — воспалительной или травматической деструкции органов брюшной полости. Перитонит является мощным воспалительным процессом, характеризующимся как местной реакцией, так и системным воспалительным ответом, а также отчетливой фазностью и стереотипностью патофизиологических сдвигов, что при сочетании с моделью АНОГ позволяет выявить возможные отличия в течении заболевания в условиях адаптации к невесомости.

*Цель данного исследования* — выявление биохимических особенностей течения перитонита в условиях АНОГ.

### Методика

Исследования выполнено на 80 белых беспородных крысах, приблизительно одного возраста (2—3 мес.), массой 240—330 г. Все животные находились в одинаковых условиях при постоянной температуре окружающей среды 23—26°C, получали одинаковое питание, были прооперированы в одинаковых временных рамках. Все животные разделены на 4 группы по 20 особей в каждой:

- 1-я группа — виварийный контроль;
- 2-я группа — АНОГ;
- 3-я группа — перитонит;
- 4-я группа — сочетание АНОГ + перитонит.

Эффекты АНОГ достигались путем вывешивания крыс на специальном стенде на срок 14 суток с последующим воспроизведением перитонита.

Стенд представляет собой каркас, на котором по двум направляющим рельсам перемещается балка с подвижной кареткой. Каретка может двигаться в любом направлении в пределах горизонтальной плоскости над сетчатым полом размером 40 на 40 см. Для подвешивания животного к подвижной каретке в целях обеспечения равномерного распределения весовой нагрузки на туловище используется специальная система состоящая из капронового костюма для крысы с отверстиями для конечностей с двумя металлическими пластинами на спинке животного к которым фиксируется костюм, что удерживает тело животного от повисания и позволяет придать избранный

угол вывешивания для всего тела. Для моделирования перитонита под эфирным наркозом, выполнялась срединная лапаротомия и продольное сечение толстой кишки на протяжении 0,5 см (на 1 см дистальнее слепой кишки). После этого производилось послойное ушивание лапаротомной раны непрерывным швом. Операционное поле обрабатывалось раствором антисептика, животное перевязывалось и помещалось в клетку. Через 24 ч животных выводили из эксперимента путем декапитации на гильотине (Open Science). Собирали образцы крови, центрифугировали, хранили при температуре — 20°C. В гепаринизированной плазме крови крыс стандартными коммерческими наборами производства фирмы «DiaSys», Германия, определяли активность аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), общей амилазы, а также концентрацию общего белка, альбумина, креатинина, мочевины и бикарбоната. Наборами фирмы «Randox», Великобритания, измеряли активность общей липазы. Концентрацию общего и прямого билирубина определяли наборами фирмы «Эко-сервис», Россия. Для измерений использовали биохимический автоанализатор «Targa ВТ 3000» фирмы «Biotechnica Instruments», Италия. Уровень калия измеряли на ионселективном анализаторе «EasyLite», фирмы «Медика», США.

Полученные данные обрабатывали с использованием методов вариационной статистики. Процедура анализа числовых значений имела следующий вид: на первом этапе проводили оценку данных на нормальность распределения. В связи с асимметричным распределением применяли непараметрический критерий Крускала—Уоллиса и рассчитывали значения для каждого параметра. Таким образом, показатели: аспаратаминотрансфераза, общий билирубин, амилаза крови, общий белок, альбумин, мочевины, натрий имели статистически значимые различия в сравниваемых группах; показатели: аланинаминотрансфераза, лактатдегидрогеназа, липаза, креатинин и калий достоверно не различались в исследуемых группах.

При выявлении статистически значимых различий, производили стягивающие межгрупповые сравнения по методу Данна для множественных выборок разного объема.

### Результаты и обсуждение

Обсуждаемые ниже различия в группах носят достоверный характер и получены путем стягивающих межгрупповых сравнений по методу Данна для множественных выборок разного объема с уровнем значимости  $p \leq 0,05$  для  $k$  (количество групп) = 4. Критическое значение  $Q$  (критерий Данна) при сравнения с контрольной группой 2,394; критическое значение  $Q$  при попарном сравнении экспериментальных групп 2,639. Числовые значения оцениваются по модулю, знак указывает направление при сравнении групп.

**Аминотрансферазы.** Наиболее доступным и информативным показателем характеризующим обмен белков является активность трансаминаз. Изменение активности аминотрансфераз наблюдаемые при гиподинамии свидетельствуют о преимущественно катаболической направленности обмена белков в тканях животных и человека [5—8]. Изучение активности АСТ в крови крыс показало достоверное повышение уровня АСТ в группе АНОГ и при сочетании АНОГ с перитонитом. При этом сочетание с перитонитом приводило более чем к 2-кратному увеличению уровня АСТ в крови по сравнению с контролем, что указывает на более тяжелое его течение. Показатели АЛТ существенно не различались.

**Билирубин общий.** Нами отмечено достоверное повышение уровня общего билирубина в группе АНОГ + перитонит по сравнению с контролем. Другие группы по данному показателю не различались. Известно, что билирубин с током крови доставляется в печень, на поверхности плазматической мембраны гепатоцита диссоциирует, и проникает в гепатоцит путем облегченной диффузии посредством белков переносчиков. При этом активность поглощения билирубина зависит от скорости его метаболизма в клетке. Наблюдаемое в эксперименте повышение уровня билирубина только в группе АНОГ + перитонит позво-

ляет предположить взаимоотношающее влияние обоих процессов на функцию печени, приводящее к значимому снижению скорости поглощения билирубина и как следствие увеличению его концентрации в крови.

**Общий белок и альбумин.** В космических полетах и при моделировании невесомости установлена фазность изменений концентрации белков крови с тенденцией к снижению [5, 6]. Показано также, что АНОГ приводит к снижению скорости синтеза белка уже после коротких сроков воздействия [8, 9]. Точный механизм, приводящий к уменьшению скорости синтеза белка во время гравитационной разгрузки, ни у человека, ни у животных в настоящий момент не известен. Однако сопоставление морфологических изменений в печени под воздействием АНОГ с наблюдаемыми в нашем исследовании статистически значимыми гипопротеемией и гипоальбуминемией можно предположить снижение ее белково-синтетической функции, на фоне усиления катаболических процессов в ответ на гравитационную разгрузку. Данные показатели имели достоверно более выраженное снижение при сочетании с перитонитом, что отражает однонаправленность эффектов АНОГ и воспалительного процесса в брюшной полости.

Таблица 1

Значение коэффициентов Данна для сравниваемых групп

Показатель	Экспериментальные группы	1. Контроль*	2. АНОГ**	3. Перитонит**
АСТ	4. АНОГ / Перитонит	<b>4,987</b>	<b>2,714</b>	2,348
	3. Перитонит	2,283	0,104	—
	2. АНОГ	2,454	—	—
Билирубин общ.	4. АНОГ / Перитонит	<b>2,734</b>	2,171	0,97
	3. Перитонит	1,587	1,048	—
	2. АНОГ	0,607	—	—
Общ. белок	4. АНОГ / Перитонит	<b>-3,282</b>	0,565	1,969
	3. Перитонит	-1,051	1,553	—
	2. АНОГ	<b>-2,934</b>	—	—
Альбумин	4. АНОГ / Перитонит	<b>-5,189</b>	<b>-2,739</b>	-2,535
	3. Перитонит	-2,278	0,070	—
	2. АНОГ	<b>-2,646</b>	—	—
Мочевина	4. АНОГ / Перитонит	<b>4,508</b>	2,117	<b>3,617</b>
	3. Перитонит	0,474	-1,818	—
	2. АНОГ	<b>2,582</b>	—	—
Амилаза	4. АНОГ / Перитонит	1,529	1,490	1,214
	3. Перитонит	0,174	<b>2,721</b>	—
	2. АНОГ	<b>3,262</b>	—	—
Натрий	4. АНОГ / Перитонит	<b>-3,889</b>	<b>-4,722</b>	-1,891
	3. Перитонит	-1,717	-2,541	—
	2. АНОГ	0,945	—	—

**Мочевина.** В большинстве исследований, проведенных во время полетов космических кораблей на орбитальных станциях «Союз-9», «Аполлон», «Скайлэб», «Салют», «Мир» и после их завершения, а также в модельных экспериментах, отмечалось увеличение выделения мочевины и мочевой кислоты с мочой, на фоне увеличения содержания мочевины в крови [1, 5—7]. В нашем исследовании отмечалось достоверное повышение уровня мочевины в крови как в группе АНОГ, так и АНОГ + Перитонит. Обращает на себя внимание статистически значимое повышение уровня мочевины в группе АНОГ + перитонит по сравнению с группой перитонит (3-я группа), что также укладывается в картину представлений об усилении катаболических эффектов при сочетанном действии гиподинамии и инфекционно-воспалительного процесса.

**Амилаза крови.** Согласно полученным нами данным, уровень амилазы крови достоверно повышался в группах АНОГ по сравнению с контролем и группе перитонита по сравнению с АНОГ. Многими авторами отмечается повышение уровня амилазы в условиях моделированной и реальной микрогравитации. Так, на 7-е сут. гипокинезии крыс отмечено повышение амилазы крови более чем в 2 раза [6]. После кратковременных космических полетов установлены случаи гиперферментемии с преобладанием инкреции амилазы и ее усиленным выведением из организма. В ходе параллельных исследований влияния антиортостатической гипокинезии и невесомости на функцию поджелудочной железы установлен феномен, получивший название симптома «уклонения» при котором наблюдается угнетение выделения амилазы по экскреторному пути, в то время как в крови наблюдалось значительное повышение ее уровня. Симптом «уклонения» в кровь панкреатических ферментов отражает напряжение экзокринной функции поджелудочной железы, которое, в свою очередь, может характеризовать функциональную готовность органа к развитию возможного нозологического процесса. В результате «уклонения» ферментов в кровь в полости желудочно-кишечного тракта создается дефицит панкреатических ферментов. При этом снижается гидролитический потенциал тонкой кишки, что характеризует состояние мальдигестии [5—7]. Указанный компонент также вносит свой вклад в усугубление диспротеинемии в условиях моделированной микрогравитации.

**Электролиты.** В ходе многих исследований были установлены изменения водно-солевого обмена в космическом полете, проявившиеся в дегидратации организма. Дегидратация сопровождалась повышенной экскрецией электролитов. Выраженность изменений концентрации электролитов и осмотически активных

веществ крови, зависела от продолжительности полетов. Исследования минерального обмена у членов экипажа «Джемми-7» во время полета выявило отрицательный баланс натрия, калия, фосфора, серы [1, 4, 8—10]. Изменения, связанные с перераспределением жидких сред организма в ответ на антиортостаз также сопровождались достоверным снижением содержания натрия в плазме крови. Как известно, нарушения водно-электролитного обмена, расстройство кислотно-основного состояния характерны и для перитонита. Электролиты частично перемещаются в интерстициальное пространство, в экссудат брюшной полости, в просвет кишечника. При сочетании АНОГ с перитонитом мы наблюдаем суммацию эффектов и практически двукратное отклонение данного показателя от нормы и соответствующих показателей группы АНОГ.

Таким образом, в результате проведенного исследования определен ряд биохимических параметров отражающих метаболические изменения, возникающие при перитоните и АНОГ. Полученные данные иллюстрируют феномен взаимного отягощения и усиления тяжести течения перитонита в условиях моделирующих эффекты микрогравитации.

*Настоящая работа подготовлена в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг., в рамках реализации мероприятия №1.2.1 Проведение научных исследований научными группами под руководством докторов наук. ГК №16.740.11.0180.*

### Список литературы

1. **Атьков О.Ю., Бедненко В.С.** Гипокинезия, невесомость: Клинические и физиологические аспекты. — М.: Наука, 1989. — 304 с.
2. **Гончаров И.Б., Ковачевич И.В., Жернавков А.Ф.** Анализ заболеваемости в космическом полете // Космическая биология и медицина. — Т. 4. — М., 2001. — С. 145-164.
3. **Григорьев А.И., Гуровский Н.Н., Егоров А.Д.** Основные механизмы невесомости // Космическая биол. и медицина. — М.: Наука, 1987. — С. 49-59.
4. **Григорьев А.И., Егоров А.Д.** Феноменология и механизмы изменения основных функций организма человека в невесомости // Космич. биология и авиакосмич. медицина. — 1988. — №6. — С. 4-17.
5. **Поляков В.В., Смирнов К.В., Бедненко В.С.** и др. Комплексная оценка функций желудочно-кишечного тракта во время космического полета // Материалы IX Всесоюз. Конф. по космич. биологии и авиакосмич. медицине. — Калуга, 1990. — С. 161-162.
6. **Смирнов К.В., Уголев А.М.** Космическая гастроэнтерология. — М.: Наука, 1981. — 277 с.

7. *Смирнов К.В.* Пищеварение и гипокинезия. — М.: Медицина, 1990. — 224 с.

8. *Fowler J.F.* Physiological changes during space flight // *Cutis.* — 1991. — Vol. 48. — P. 291-295.

9. *Nicogossian M.C., Sawin C.F., Huntoon C.L.* Overall physiologic response to space flight / Nicogossian A.E., Huntoon C.L., Pool S.L., eds. *Space Physiology and Medicine.* 3<sup>rd</sup> ed. — Philadelphia, Pa: Lea & Febiger; 1994. — P. 213-228.

10. *Scott M. Smith, Jane M. Krauhs, Carolyn S. Leach.* Regulation of body fluid volume and electrolyte concentrations in spaceflight // *Advances in Space Biology and Medicine.* — 1997. — Vol. 6. — P. 123-165.

Поступила 01.11.2012

#### Сведения об авторах:

*Панченков Дмитрий Николаевич*, д-р мед. наук, проф., зав. каф. хирургии ФПДО ГБОУ ВПО МГМСУ им. А.И. Евдокимова, зав. лаб. минимально инвазивной хирургии отд. клинической медицины НИМСИ МГМСУ

*Астахов Дмитрий Анатольевич*, мл. науч. сотр. лаб. физиологических проблем невесомости ФГБУ «НИИОПП» РАМН, аспирант лаб. минимально инвазивной хирургии НИМСИ МГМСУ

*Нечунаев Алексей Александрович*, канд. мед. наук, ассистент каф. хирургии ФПДО ГБОУ ВПО МГМСУ им. А.И. Евдокимова

*Леонов Сергей Дмитриевич*, канд. мед. наук, доц. каф. хирургии ФПДО ГБОУ ВПО МГМСУ им. А.И. Евдокимова

*Бехтева Марина Евгеньевна*, асп. лаб. минимально инвазивной хирургии НИМСИ МГМСУ

А.А. Орлов<sup>1</sup>, И.Н. Сабурин<sup>1</sup>, М.Х. Диланян<sup>1</sup>, Л.Н. Скуратовская<sup>1</sup>,  
В.С. Репин<sup>1</sup>, Л.Е. Серебрикова<sup>2</sup>, М.Ю. Житков<sup>2</sup>, Э.Е. Евсеенков<sup>1</sup>

## **Динамика формирования костной ткани у крыс под действием нового остеопластического материала «Norian»**

<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 «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Минздравсоцразвития, 119991, Москва, ул.Тимура Фрунзе, 16

*В эксперименте на крысах линии CD проводилось сравнительное исследование действия остеопластического материала NORIANCRS на скорость регенерации костной ткани нижней челюсти последенальной имплантации (титановый винт) и сочетанного влияния на эти процессы NORIANCRS и протеинового белка (Emdogein). Функциональность и зрелость новообразованной костной ткани оценивалась гистологическим и биохимическими методами. Результаты проведённого исследования свидетельствуют, что использование остеопластического материала NORIANCRS уже к 120-м сут. приводит к практически полной регенерации костной ткани. Установлено также, что сочетанное использование NORIANCRS и протеинового белка Emdogein нецелесообразно, так как его добавление не ускоряет процесс регенерации костной ткани, а на ранних сроках после операционного периода может вызвать воспалительную реакцию.*

**Ключевые слова:** костная пластика, остеопластические материалы, денальная имплантация

А.А. Orlov<sup>1</sup>, I.N. Saburina<sup>1</sup>, M.Kh. Dilanyan<sup>1</sup>, L.N. Skuratovskaya<sup>1</sup>,  
V.S. Repin<sup>1</sup>, L.E. Serebrikova<sup>2</sup>, M.Yu. Zhitkov<sup>2</sup>, E.E. Evseenkov<sup>1</sup>

## **Dynamics of formation of bone tissue in rats under the influence of new xenotransplantat «Norian»**

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

<sup>2</sup> Central Research Institute of Dental and Maxillofacial Surgery, 16, Timura Frunze str., Moscow, 119991, Russia

*In experiments on rats CD comparative studies have been carried out which is the effect of osteoplastic material NORIAN CRS, the rate of bone regeneration after mandibular dental implants (titanium screw) and the combined effect of these processes NORIAN CRS protein and protein (Emdogein). Functionality and maturity of the newly formed bone tissue was evaluated by histological and biochemical methods. The results suggest that the use of osteoplastic material NORIAN CRS is the 120 days leading to almost complete regeneration of bone tissue. It was also found that the combined use of NORIAN CRS and protein Emdogein impractical because adding Emdogein not accelerate bone regenerative process, but in the early postoperative period may cause an inflammatory reaction.*

**Key words:** bone plastic, osteoplastic materials, dental implantation

Устранение дефектов костной ткани за счет естественных процессов регенерации часто невозможно или слишком длительно. Поэтому для их хирургического лечения широко используют различные остеопластические материалы. Лучшим из них на сегодняшний день считается аутокость [1]. Однако ее применение связано с определенными трудностями и сопровождается дополнительной травмой пациента. Использование имплантатов из искусственных остеопластических материалов имеет много достоинств, к недостаткам можно отнести часто недо-

статочную скорость регенерации кости и трудности, связанные с точной подгонкой формы и размера имплантата к заполняемому дефекту. Новый остеопластический материал «Нориан» (Norian Craniofacial Repair System Fast Set производство фирмы Norian, США) представляет собой комбинацию порошка и жидкости, после их смешения в заданном соотношении образуется пластичная масса с хорошей адгезией к костной ткани, которой легко можно придать любую требуемую форму. Через несколько минут она застывает и приобретает прочность, сопоставимую с прочностью костной ткани. По данным фирмы-изготовителя остеопластические свойства этого материала соответствуют обычным имплантационным материалам на основе фосфатов кальция.

**Для корреспонденции:** Диланян Мамикон Хачатурович, аспирант ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: mdilanyan@mail.ru

*Цель работы* — биохимическая и гистологическая характеристика динамики регенерации кости у крыс после заполнения дефектов в нижней челюсти материалом «Нориан» и оценка влияния на скорость заживления дефектов геля «Эмдогейн» (Emdogain), используемого в стоматологии для ускорения регенерации тканей пародонта.

### Методика

Исследование проведено на 24 крысах линии CD в возрасте 12—14 недель. На наружной поверхности тела левой нижней челюсти в области угла вкручивался титановый винт-имплантат. Далее конструкция закрывалась пластиковой массой остеопластического материала Norian CRS в соответствии с инструкцией, прилагаемой к стандартной упаковке. Через 6 мин остеопластический материал затвердевал (группа 1). Части животных (группа 2) в область операционного вмешательства, в целях стимуляции остеогенеза, дополнительно вводился препарат Emdogain представляющий собой особый белок в гелевой матрице в стандартной расфасовке по 0,7 мл. Введение Emdogain проводилось однократно во время операции при помощи микропипетки в дозе 0,05 мл (50 мкл) для каждого животного. После чего рана была послойно ушита. Третья группа крыс составляла группу контроля.

На 21-е, 60-е, 120-е и 180-е сут. после операции по 3 животных из каждой группы были подвергнуты эвтаназии. Из челюсти в области имплантации титанового винта выпиливали блоки и проводили их гистологическое и биохимическое исследование. Биохимическое исследование проводили только в сроки 60, 120 и 180 сут.

Для биохимического исследования материал сохраняли при  $-25^{\circ}\text{C}$ . Пробы костной ткани не размораживая помещали в охлажденную фарфоровую ступку и измельчали до однородного состояния. Экстрагирование осуществляли 0,05 М фосфатным буфером pH 7,2 в количестве 1 мл на 10 мг ткани в течение 2 сут. при  $+4^{\circ}\text{C}$ . В полученном экстракте определяли содержание общего белка и активность ферментов аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ). Активность ферментов пересчитывали на 1 г белка экстракта. Определение белка проводили биуретовым методом, АСТ, АЛТ и ЩФ по методикам фирмы BioSystems (Испания) с наборами реактивов этой фирмы.

Навески ткани 4 раза деминерализовали по 2 сут. при  $+4^{\circ}\text{C}$  0,05 М фосфатным буфером pH 7,2 с 0,1 М трилона Б в количестве 1 мл на мг ткани. После деминерализации из навесок экстрагировали 0,4 М уксусной кислотой в количестве 1 мл на 50 мг ткани в течение 2 сут. при  $+4^{\circ}\text{C}$  кислоторастворимый

коллаген. В полученном экстракте определяли содержание коллагена по о-пролину. Содержание коллагена пересчитывали на 1 мг свежей ткани.

В качестве стандарта использовали кислоторастворимый коллаген из сухожилий крысиных хвостов, полученный по методике [7]. Раствор коллагена диализовали в течение 24 ч, затем высушивали 10 сут. в вакуум-эксикаторе над безводным хлоридом кальция. Сухой коллаген (10 мкг/мл) растворяли в 0,1 М уксусной кислоте. Полученный раствор использовали в качестве эталонного раствора. Пробы кислотных экстрактов ткани и эталонного раствора коллагена анализировали параллельно на содержание о-пролина по методике [3]. Общность происхождения коллагена и способа его экстракции, а также параллельный гидролиз в одинаковых условиях проб и эталонных растворов позволили непосредственно определять содержание коллагена в пробах.

Определения проводили на биохимическом анализаторе BTS 370 (фирма BioSystems, Испания).

Для сравнения использовали результаты анализа по аналогичной методике интактной костной ткани нижней челюсти 24 контрольных крыс линии CD сопоставимых по возрасту с опытными. Для гистологического исследования материал фиксировали в забуференном формалине. После декальцинации и приготвления срезов по общепринятой методике с заливкой в парафин, срезы окрашивали гематоксилин-эозином. При гистологическом исследовании кроме обычной оценки гистологической картины проводили морфометрическое исследование.

### Результаты и обсуждение

Результаты исследования приведены в таблице и на рис. 1 и 2. Между группами 1 (без препарата Emdogain) и 2 (с препаратом Emdogain) различия всех показателей по t-критерию Стьюдента были незначимы ( $p > 0,05$ ). В срок 60 сут. после операции выше, чем в группе сравнения были активность трансаминаз АСТ и АЛТ и ЩФ в группе 1 и активность АСТ в группе 2. Это может указывать на несколько большую активность процессов формирования костного матрикса, в частности, пролиферации и дифференцировки остеобластов в группе 1. Содержание кислоторастворимого коллагена в обеих группах в сроки 60 и 120 сут. после операции было выше, чем в группе сравнения. Таким образом, скорость созревания коллагена в обеих группах была примерно одинакова. Средние значения всех исследованных показателей в срок 180 сут. становятся практически равными контрольному значению для интактной костной ткани ( $p > 0,05$ ), что указывает на завершение процессов синтеза костной ткани и переход ее в относительно стационарное состояние, соответствующее возрасту.

Содержание общего белка, аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), щелочной фосфатазы (ЩФ) в экстрактах

Срок, сут.	Белок, г/л	АСТ, Е/г белка	АЛТ, Е/г белка	ЩФ, Е/г белка	Коллаген, мкг/г ткани	
60 сут.	Группа 1	39±4	1,43±0,61	0,99±0,28	0,65±0,18	107±35
	Группа 2	45±5	1,26±0,60	0,79±0,27	0,59±0,18	105±35
120 сут.	Группа 1	40±7	0,80±0,45	0,61±0,38	0,41±0,40	93±25
	Группа 2	26±5	1,05±0,50	0,90±0,39	0,71±0,41	77±25
180 сут.	Группа 1	42±8	0,57±0,44	0,47±0,15	0,29±0,15	81±27
	Группа 2	36±5	0,90±0,44	0,63±0,18	0,46±0,15	59±27
Группа сравнения	35±4	0,82±0,23	0,64±0,11	0,48±0,10	65±17	

К сроку 21-х суток судя по гистологической картине, отмечается интенсивное образование костной ткани и растворение остеопластического материала. В ряде случаев наблюдалось формирование заметной доли фиброзной соединительной ткани. В группе 2 (с препаратом Эмдогейн) по сравнению с группой 1 существенно выражены воспалительные реакции. Признаки воспалительных процессов отмечаются до 60-х суток. В более поздние сроки они не выявляются.

Полученные результаты показывают, что уже через 120 сут. (4 мес.) после операции регенерация костной ткани в обеих опытных группах в основном завершается и костный цемент оказывается большей частью замещен костью. Как и следовало ожидать, различия в скорости формирования костной ткани в зависимости от методики ее замещения к 4—6 мес. сглаживаются. Очевидно, к этому времени большая часть активных компонентов (факторов роста тканей зубов свиньи) в препарате Emdogain уже абсорбирована [7]. Различия в характере регенеративных процессов между группами невелики. В группе 2 можно отметить некоторое замедление регенерации кости, которое можно связать с воспалительными реакциями в ранние сроки и преобладанием соединительнотканых элементов в регенерате. Воспаление, скорее всего, вызвано реакцией на препарат Эмдогейн, а преимущественное образование соединительной

ткани может быть обусловлено специфическим действием активных компонентов препарата. Этими особенностями вызвана большая скорость снижения содержания кислоторастворимого коллагена в группе 2 по сравнению с группой 1. Активность трансаминаз, связанная с интенсивностью процессов пролиферации клеток, в ранние сроки была выше в группе 1. Активность ЩФ в экстракте, отражающая интенсивность процессов минерализации костного матрикса, через 60 сут. после операции также была выше в группе 1.

Динамика биохимических и гистологических показателей, отражающих регенерацию костной ткани, в целом, соответствует нормальному ходу этого процесса в присутствии остеоиндуктивных материалов [1, 2, 4—6, 9].

Можно заключить, что препарат Emdogain в ранние сроки (до 2—3 мес.) может ухудшить регенерацию дефектов костной ткани вследствие воспалительных процессов. В более поздние сроки наблюдается меньшая минерализация образованного костного матрикса и преобладание в регенерате волокнистой соединительной ткани. Признаков усиления репаративных процессов в костной ткани при введении этого препарата в сочетании с остеопластическим материалом Norian не отмечено. Поэтому его применение совместно с костным цементом Norian нецелесообразно.

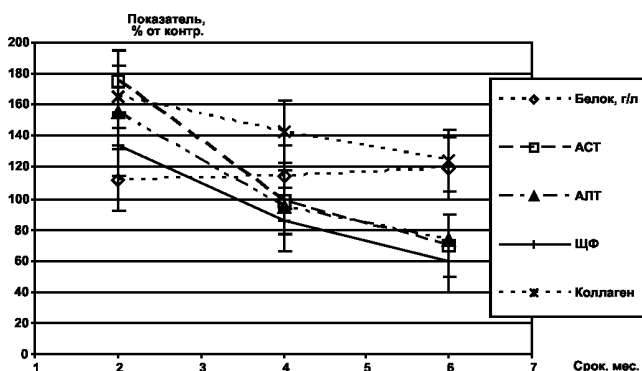


Рис. 1. Группа 1. Активность ферментов АСТ, АЛТ и ЩФ и содержание коллагена (% от значений для группы сравнения)

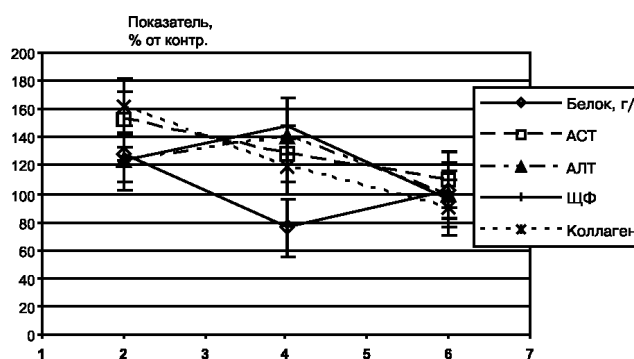


Рис. 2. Группа 2. Активность ферментов АСТ, АЛТ и ЩФ и содержание коллагена (% от значений для группы сравнения)

## Список литературы

1. *Арсеньев И.Г.* Экспериментально-морфологическое обоснование клинического применения деградируемых биоимплантатов в комплексном лечении переломов и ложных суставов длинных трубчатых костей: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — М., 2007.
2. *Лекишвили М.В., Горбунова Е.Д., Васильев М.Г.* и др. Пластика дефектов костей черепа у детей деминерализованными костными аллоимплантатами // Детская хирургия. — 2004. — №5. — С. 9-12.
3. *Орехович В.Н.* (ред.) Современные методы в биохимии. — М.: Медицина, 1977. — 592 с.
4. *Панасюк А.Ф., Ларионов Е.В.* Хондроитинсульфаты и их роль в обмене хондроцитов и межклеточного матрикса хрящевой ткани // Научно-практическая ревматология. — 2000. — №2. — С. 46-55.
5. *Норина С.В.* Диагностика и эффективность лечения остеоартроза коленных суставов на поликлиническом уровне: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — Хабаровск, 2007.
6. *Шишков Н.В.* Влияние биокомпозиционных материалов на регенерацию костной ткани при заполнении дефектов челюстных костей после удаления радикулярных кист: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — М., 2005.
7. *Chandrakasan G., Torchia D.A., Piez K.A.* Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution // J. Biol. Chem. — 1967. — №251. — P. 6062-6067.
8. *Finkemeier C.G.* Bone-grafting and bone-graft substitutes // J. Bone Jr. Surg. A. — 2002. — Vol. 84, №3. — P. 454-464.
9. *Kawai T., Urist M.R.* Quantitative computation of induced heterotopic bone formation by an image analysis system // Clin. Orthop. — 1988. — №233. — P. 262-267.

Поступила 14.10.2012

## Сведения об авторах:

*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

*Скуратовская Лариса Николаевна*, учёный секретарь ФГБУ «НИИОПП» РАМН

*Репин Вадим Сергеевич*, проф., член-корр. РАМН д-р биол. наук, ведущий науч. сотр. лаб. новых клеточных технологий ФГБУ «НИИОПП» РАМН

*Серебрикова Лариса Евгеньевна*, канд. мед. наук, зав. биохим. лаб. ФГУ ЦНИИС и ЧЛХ Минздравсоцразвития

*Житков Михаил Юрьевич*, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. биохим. лаб. ФГУ ЦНИИС и ЧЛХ Минздравсоцразвития

*Евсеев Эдуард Евгеньевич*, аспирант ФГБУ «НИИОПП» РАМН



Д.С. Суханов<sup>1</sup>, Т.И. Виноградова<sup>2</sup>, С.Н. Демидик<sup>3</sup>,  
Н.В. Заболотных<sup>2</sup>, С.Н. Васильева<sup>2</sup>, А.Л. Коваленко<sup>4</sup>, М.Л. Витовская<sup>2</sup>

## **Иммунотропная и антигипоксанта́ная терапия экспериментального лекарственно-чувствительного и лекарственно-устойчивого туберкулеза**

<sup>1</sup> 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> Федеральное государственное бюджетное учреждение Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., 2-4

<sup>3</sup> Учреждение образования Гродненский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Республики Беларусь, 230009, Республика Беларусь, г.Гродно, ул. Горького, 80

<sup>4</sup> ООО «НТФФ «ПОЛИСАН», 191119, Санкт-Петербург, Лиговский пр., 112

*Представлены результаты доклинического изучения циклоферона, ремаксола и рунихола на модели экспериментального генерализованного туберкулеза, вызванного МБТ с различным спектром лекарственной чувствительности. Установлено существенное повышение лечебного эффекта химиотерапии с помощью циклоферона и ремаксола. Это проявилось усилением клиренса легких от МБТ, снижении распространенности специфического воспаления в легких по индексу поражения легких, стимуляции поглотительной и переваривающей способности перитонеальных макрофагов, ингибированной в ходе развития экспериментальной туберкулезной инфекции. Рунихол не оказывал влияния на эффективность химиотерапии при отсутствии стимулирующего влияния на фагоцитарную функцию пМф.*

**Ключевые слова:** экспериментальный туберкулез, циклоферон, ремаксол, рунихол

D.S. Sukhanov, T.I. Vinogradova, S.N. Demidik,  
N.V. Zabolotnyh, S.N. Vasilieva, A.L. Kovalenko, M.L. Vitovskaya

## **Immunotropic and antihypoxant therapy of experimental drug-sensitive and drug-resistant tuberculosis**

<sup>1</sup> Mechnikov North-Western State Medical University, 41, Kirochnaya str., Saint-Petersburg, 191015, Russia

<sup>2</sup> Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Phthisiopulmonology, 2-4, Ligovskiy distr., Saint-Petersburg, 191036, Russia

<sup>3</sup> Grodno State Medical University, 80, Gorkogo str., Grodno, 230009, Belarus

<sup>4</sup> «POLYSAN» Ltd, 112, Ligovskiy distr., Saint-Petersburg, 191119, Russia

*The results of pre-clinical research of cycloferon, remaxol and runihol on the model of experimental generalized tuberculosis, caused by the MBT with a different spectrum of drug sensitivity are presented. A considerable increase of the curative effect of the therapy with the used of cycloferon and remaxol. There was manifested the strengthening of lung clearance from the office, reducing the prevalence of specific inflammation in the lungs of the index of lung damage, stimulation of sorption and destructive ability of peritoneal macrophages, inhibited in the course of development of experimental tuberculosis infection. Runihol has no impact on the effectiveness of chemotherapy in the absence of a stimulating influence on the phagocytic function of the peritoneal macrophages.*

**Key words:** experimental tuberculosis, cycloferon, remaxol, runihol

Недостаточная эффективность лечения туберкулеза в современных условиях, особенно при наличии лекарственной устойчивости возбудителя, вызывает необходимость поиска новых методов и средств терапии. Наряду с внедрением новых этиотропных

средств воздействия, большое значение имеет использование фармакологических препаратов патогенетической направленности [3]. Комбинированная химиотерапия, вызывая нарушения в клеточном метаболизме, отрицательно влияет на функциональную активность иммунокомпетентных клеток и делает обоснованным применение лекарственных препаратов, усиливающих фагоцитарные реакции, что способствует элиминации возбудителя туберкулеза [1, 5, 8].

**Для корреспонденции:** Суханов Дмитрий Сергеевич, канд. мед. наук, доц. каф. фтизиопульмонологии и торакальной хирургии ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава РФ. E-mail: dmitriysukhanov@mail.ru

Перспективными патогенетическими препаратами в лечении туберкулеза являются индукторы интерферона (циклоферон) и препараты на основе янтарной кислоты (ремаксол, рунихол), эффективность которых показана в ряде доклинических и клинических исследованиях [6, 7]. Вместе с тем, данные о влиянии вышеперечисленных препаратов на течение туберкулезного процесса в эксперименте в настоящее время отсутствуют.

*Цель исследования* — доклиническое изучение действия циклоферона, ремаксоло и рунихола на модели экспериментального генерализованного туберкулеза.

### Методика

Эксперименты проводились на 218 белых нелинейных мышах-самцах, распределенных на группы с помощью метода рандомизации. Поставлено 2 серии опытов на моделях экспериментального генерализованного лекарственно чувствительного (ЛЧТ) и лекарственно устойчивого туберкулеза (ЛУТ).

*1-я серия* — экспериментальный туберкулез, вызванный лекарственно чувствительным штаммом *M. tuberculosis Erdman*. Для моделирования туберкулеза использовали лабораторный тест-штамм *M. tuberculosis Erdman* (входящий в *Mycobacterium tuberculosis complex*), чувствительный к противотуберкулезным препаратам, из коллекции ФГУ «НИИ стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича». Заражающая доза —  $10^6$  КОЕ/мышь в 0,2 мл физиологического раствора. Суспензию микобактерий туберкулеза (МБТ) вводили мышам в латеральную хвостовую вену (0,2 мл).

Группы животных:

1. Интактные мыши (*незараженные, нелеченные*) — 15 шт.;

2. Зараженные мыши без лечения (*контроль заражения*) — 20 шт.;

3. Зараженные мыши, получавшие полихимиотерапию (ПХТ): изониазид (10 мг/кг, подкожно) + рифампицин (10 мг/кг, внутривенно) + пиперазид (20 мг/кг, внутривенно) — *контроль полихимиотерапии* — 18 шт.;

4. Зараженные мыши, получавшие циклоферон (3,6 мг/кг, внутривенно, 3 раза в неделю) + ПХТ — 18 шт.;

5. Зараженные мыши, получавшие ремаксол (25 мг/кг, внутривенно, 14 введений, 5 инъекций в неделю) + ПХТ — 18 шт.;

6. Зараженные мыши, получавшие рунихол (396 мг/кг, внутривенно) + ПХТ — 18 шт.

*2-я серия* — экспериментальный туберкулез, вызванный лекарственно устойчивым клиническим штаммом №9660 ФГБУ СПбНИИФ Минздрава РФ. Для моделирования туберкулеза использовали

клинический изолят МБТ №9660 СПбНИИФ, устойчивый к изониазиду (1 мг/мл), рифампицину (40 мг/мл), стрептомицину (10, 50 мг/мл), этионамиду (2 мг/мл), канамицину (30 мг/мл) выделенный от больного впервые выявленным туберкулезом легких. Заражающая доза —  $10^6$  КОЕ/мышь в 0,2 мл физиологического раствора. Суспензию микобактерий туберкулеза (МБТ) вводили мышам в латеральную хвостовую вену (0,2 мл).

Группы животных:

1. Интактные мыши (*незараженные, нелеченные*) — 15 шт.;

2. Зараженные мыши без лечения (*контроль заражения*) — 20 шт.;

3. Зараженные мыши, получавшие полихимиотерапию (ПХТ): протионамид (12,5 мг/кг, внутривенно) + амикацин (30 мг/кг, подкожно) + левофлоксацин (20 мг/кг, внутривенно) + ПАСК (140 мг/кг, внутривенно) + циклосерин (8 мг/кг, внутривенно) — *контроль полихимиотерапии* — 19 шт.;

4. Зараженные мыши, получавшие циклоферон (3,6 мг/кг, внутривенно, 3 раза в неделю) + ПХТ — 19 шт.;

5. Зараженные мыши, получавшие ремаксол (25 мг/кг, внутривенно, 14 введений, 5 инъекций в неделю) + ПХТ — 19 шт.;

6. Зараженные мыши, получавшие рунихол (396 мг/кг, внутривенно) + ПХТ — 19 шт.

В обеих сериях опытов с 7-х сут. после заражения с периодичностью в 2—3 сут. проводилось вскрытие мышей ( $n=2$ ) с целью визуализации в легких очагов специфического воспаления. Через 17 сут. после инокуляции инфекта в легких зараженных животных были обнаружены очаги специфического воспаления, с этого дня в опытных группах начато лечение. Курс лечения во всех исследуемых группах составил 6 нед.

В течение исследования регистрировали:

а) индекс поражения легких (устанавливали по совокупности экссудативных и продуктивных изменений) в условных единицах — баллах [1];

б) биометрические показатели (коэффициенты массы (КМ) легких и селезенки);

в) бактериологические показатели (количество колониеобразующих единиц — КОЕ);

г) фагоцитоз перитонеальных макрофагов (пМф): фагоцитарная активность Мф (ФА), фагоцитарное число (ФЧ), показатель завершенности фагоцитоза (ПЗФ), индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ).

*Индекс эффективности лечения ИЭ (%)* рассчитывали как долевую разницу показателей тяжести течения туберкулезной инфекции в контрольных группах и в группах животных, получавших исследуемые препараты.

Статистическая обработка полученных результатов проведена с помощью метода ANOVA для множественного сравнения выборочных средних с последующим использованием защищенного t-критерия. При анализе показателей фагоцитоза с учетом распределения данных, отличного от нормального, применялся непараметрический тест Краскела—Уоллиса с последующим попарным сравнением с помощью теста Данна [2]. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

### *Эффективность изучаемых препаратов при ЛЧ туберкулезе*

Инокуляция животным лекарственно чувствительного штамма *M. tuberculosis Erdman* вызывала клиническую картину генерализованного туберкулеза с преимущественным поражением легких, что нашло отражение в высоких значениях индекса поражения легких —  $3,1 \pm 0,05$  усл. ед., а также среднего суммарного показателя пораженности — 44,99 усл. ед.

В группе контроля химиотерапии на этом сроке отмечено снижение показателей тяжести течения инфекции: коэффициента массы легких в 3,1 раза, индекса поражения легких в 1,5 раза (с  $3,1 \pm 0,05$  усл. ед. до  $2,05 \pm 0,06$  усл. ед.). Зарегистрировано также достоверное увеличение клиренса легких от МБТ в 6,7 раза ( $171,4 \pm 22,69$  КОЕ  $\times 10^3$  против  $25,4 \pm 1,72$  КОЕ  $\times 10^3$ ,  $p < 0,001$ ). Отмечен прирост индексов эффективности по всем исследуемым показателям: по коэффициенту массы легких — на 67,95%, по индексу поражения легких — на 33,87%, по коэффициенту массы селезенки — на 56,06%, по высеваемости МБТ из легких — на 85,18%. При этом средний суммарный ИЭ химиотерапии составил +60,77%.

В условиях дополнительного применения циклоферона наблюдалось повышение эффективности химиотерапии на 27,9%, что способствовало достоверному снижению индекса поражения легких в 1,2 раза ( $2,05 \pm 0,06$  усл. ед. против  $1,65 \pm 0,02$  усл. ед.,  $p < 0,001$ ) и числа КОЕ МБТ из легких в 4,9 раза ( $5,2 \pm 1,76$  усл. ед. против  $25,4 \pm 1,72$  усл. ед.,  $p < 0,001$ ).

Использование ремаксола на фоне противотуберкулезной терапии также снижало показатели тяжести течения инфекции: индекс поражения легких в 1,2 раза (с  $2,05 \pm 0,06$  усл. ед. до  $1,75 \pm 0,03$  усл. ед.,  $p < 0,001$ ). Зарегистрировано также достоверное увеличение клиренса легких от МБТ в 3,8 раза, ( $25,4 \pm 1,72$  КОЕ  $\times 10^3$  против  $6,7 \pm 2,5$  КОЕ  $\times 10^3$ ,  $p < 0,001$ ). Отмечен прирост индексов эффективности по трем из четырех исследуемых показателей: по коэффициенту массы легких — на 9,02%, по индексу

поражения легких — на 14,63%, по высеваемости МБТ из легких — на 73,62%. При этом прирост эффективности лечения в среднем за счет ремаксола составил 20,44% по сравнению с группой контроля химиотерапии.

В условиях применения рунихола в комбинации с ПТП большинство показателей не отличались от таковых в группе контроля химиотерапии. Отмечен незначительный прирост интегрального показателя эффективности терапии — бактериовыделения МБТ из легких, который составил +12,99% при +79,53% и +73,62% у животных, леченных соответственно циклофероном и ремаксолом. Средний совокупный прирост эффективности лечения за счет применения рунихола составил 6,78%.

Анализ эффективности фагоцитоза пМф показал, что у зараженных *M. tuberculosis Erdman* нелеченных мышей на фоне обширного туберкулезного поражения легочной ткани развивается достоверное угнетение как поглотительной, так и переваривающей способности Мф по всем тестируемым показателям при сравнении с интактной группой. Фагоцитарная активность снижалась в среднем до 39,2% против 55,0% у интактных мышей ( $p < 0,05$ ), фагоцитарное число — до 3,98 дрожжевых клеток против 5,4 дрожжевых клеток ( $p < 0,01$ ), показатель завершенности фагоцитоза — до 36,8 дрожжевых клеток против 178 ( $p < 0,01$ ), индекс завершенности фагоцитоза — до 1,39 усл. ед. против 3,05 усл. ед. ( $p < 0,01$ ).

Активность фагоцитоза у мышей, получавших шестинедельный курс комбинации ПХТ по 2 из 4 из четырех исследованных показателей (фагоцитарное число и индекс завершенности фагоцитоза) была значимо ниже, чем у животных группы контроля заражения. Эти данные согласуются с результатами наших предыдущих исследований и демонстрируют ингибцию поглотительной и переваривающей функции макрофагов под влиянием длительной (более месяца) терапии противотуберкулезными препаратами [4].

Включение циклоферона в терапию лекарственно чувствительного туберкулеза у мышей приводило к существенной стимуляции активности ингибированных туберкулезной инфекцией и длительной специфической терапией пМф по всем изученным показателям ( $p < 0,05—0,01$  по сравнению с показателями группы контроля химиотерапии) — фагоцитарная активность достигла 91,3%, а фагоцитарное число — 80,2% от уровня здоровых нелеченных животных. Переваривающая способность пМф была стимулирована несколько слабее (показатель завершенности фагоцитоза — до 57,3%, индекс завершенности фагоцитоза — до 59,0% от уровня интактной группы), но ее параметры также оказались статистически значимо выше, чем у мышей, леченных только ПТП.

Ремаксол оказывал существенное положительное влияние как на поглотительную, так и на переваривающую способность пМф, значимо повышая все показатели по сравнению с параметрами группы контроля химиотерапии ( $p < 0,05$ — $0,01$ ). Подобно циклоферону ремаксол, более активно стимулировал поглотительную способность пМф, повысив фагоцитарную активность до 89,1%, а фагоцитарное число — до 87,0% от уровня здоровых нелеченных мышей. Переваривающая способность макрофагов подвергалась меньшей стимуляции (показатель завершенности фагоцитоза — до 52,8%, индекс завершенности фагоцитоза — до 54,1% от уровня интактной группы), но также существенно превышала аналогичные показатели как контроля заражения, так и контроля химиотерапии.

Назначение рунихола практически не повлияло на фагоцитарную функцию пМф: параметры как поглотительной, так и переваривающей способности макрофагов находились на уровне мышей группы контроля химиотерапии.

#### *Эффективность изучаемых препаратов при ЛУ туберкулезе*

При инокуляции животным клинического изолята ЛУ МБТ развивалась клиническая картина генерализованного туберкулеза с преимущественным поражением легких с наличием экссудативных изменений и продуктивных очагов спедифического воспаления, в посевах гомогенатов легких отмечен сплошной рост МБТ.

Под влиянием проведенной химиотерапии отмечено достоверное снижение показателей тяжести течения инфекции: коэффициента массы легких в 1,7 раза ( $p < 0,05$ ) и индекса их поражения в 1,2 раза ( $p < 0,001$ ), а также коэффициента массы селезенки в 1,4 раза ( $p < 0,01$ ). Зарегистрировано также и достоверное увеличение в 2,8 раза клиренса легких от МБТ ( $p < 0,02$ ). Отмечен прирост индексов эффективности по всем исследуемым показателям: по коэффициенту массы легких — на 40,9%, по индексу поражения легких — на 13,0%, по коэффициенту массы селезенки — на 29,9%, по высеваемости МБТ из легких — на 64,8%. При этом средний суммарный индекс эффективности лечения составил +36,9%.

Включение циклоферона в комплексную химиотерапию существенно повышало ее эффективность, о чем свидетельствовали достоверное снижение индексов поражения легких в 1,2 раза ( $2,36 \pm 0,07$  усл. ед. против  $2,75 \pm 0,07$  усл. ед. у мышей контроля химиотерапии,  $p < 0,001$ , прирост индекса эффективности — на 14,18%) и высеваемости МБТ из легких в 2,4 раза ( $19,4 \text{ КОЕ} \times 10^4$  против  $45,9 \pm 2,5 \text{ КОЕ} \times 10^4$ ,

$p < 0,001$ , прирост индекса эффективности на 57,73%). Вычисление среднего индекса эффективности лечения показало его повышение по сравнению с группой контроля химиотерапии на 22,71% за счет трех из четырех тестируемых показателей: коэффициента массы легких — на 25,71%, индекса их поражения — на 14,18%, а также числа КОЕ — на 57,73%.

При назначении ремаксола также отмечен более отчетливый лечебный эффект. Так, на момент завершения курса лечения под влиянием ремаксола произошло достоверное снижение индекса поражения легких в 1,14 раза ( $2,42 \pm 0,06$  усл. ед. против  $2,75 \pm 0,07$  усл. ед. в контроле химиотерапии,  $p < 0,001$ ) и уменьшение высеваемости МБТ в 1,98 раза ( $23,2 \pm 1,3 \text{ КОЕ} \times 10^4$  против  $45,9 \pm 2,5 \text{ КОЕ} \times 10^4$ ,  $p < 0,001$ ). По этому показателю зарегистрирован наиболее высокий прирост эффективности терапии — на 49,46%. Средний прирост эффективности за счет применения ремаксола на фоне ПТП составил +23,74%.

В условиях применения рунихола в комплексе с ПТП наблюдался незначительный прирост эффективности лечения — всего на 6,39%, в основном по коэффициенту массы легких и по высеваемости МБТ.

Функциональное состояние пМф при распространенном лекарственно устойчивом туберкулезе на 59-е сут. после заражения имело практически ту же степень ингибиции, что и при лекарственно чувствительном процессе. У зараженных нелеченных мышей все показатели фагоцитоза были достоверно ( $p < 0,01$ ) ниже, чем в интактной группе и составляли 12,7—73,0% от соответствующих значений у здоровых мышей.

Этиотропная терапия (PtATPASCs) в данном опыте слабо отражалась на состоянии поглотительной и переваривающей функции макрофагов. Отмечено значимое снижение при ее использовании одного из показателей поглотительной способности пМф — фагоцитарной активности (35,0% при 44,8% в контроле заражения,  $p < 0,05$ ).

Включение циклоферона в базовую химиотерапию приводило к значительной стимуляции как поглотительной, так и переваривающей способности пМф по достоверному повышению трёх из четырёх исследованных параметров фагоцитоза. Так, фагоцитарная активность увеличивалась в 1,4 раза (48,0% против 35,0% в группе контроля химиотерапии,  $p < 0,05$ ), ПЗФ — в 2,27 раза — (78,2 дрожжевых клеток против 34,4 дрожжевых клеток,  $p < 0,05$ ), ИЗФ — в 1,76 раза — ( $2,12$  усл. ед. против  $1,2$  усл. ед.,  $p < 0,01$ ).

Под действием ремаксола, как и циклоферона, фагоцитарная функция пМф у мышей практически по всем параметрам оказалась достоверно повышенной по отношению к группе контроля химиотерапии. Фагоцитарная активность при использовании ремаксола возрастала на 45,7% по сравнению с группой контроля лечения ( $p < 0,01$ ), показатель завершенности фагоцитоза — на 183,4% ( $p < 0,01$ ), а индекс завершенности фагоцитоза — на 69,2% ( $p < 0,01$ ).

Применение рунихола не оказывало стимулирующего эффекта на показатели фагоцитоза пМф, все исследованные параметры фагоцитарной функции макрофагов достоверно не отличались от таковых у мышей группы контроля химиотерапии и были значительно снижены по сравнению с показателями животных интактной группы.

### Заключение

Таким образом, анализ полученных результатов убедительно продемонстрировал отчетливое и значимое повышение эффективности химиотерапии лекарственно чувствительного и лекарственно устойчивого туберкулеза у мышей в условиях применения циклоферона и ремаксола в комплексе с основными и резервными ПТП. Применение рунихола на обеих моделях не оказывало влияния на эффективность химиотерапии.

Полученные данные по изучению влияния исследованных препаратов на фагоцитарную функцию пМф свидетельствуют о том, что циклоферон и ремаксол при их использовании в составе комплексной химиотерапии лекарственно чувствительного и лекарственно устойчивого туберкулеза у мышей оказывало стимулирующее воздействие на поглотительную и переваривающую способность пМф, резко угнетенную как самой туберкулезной инфекцией, так и длительной массивной химиотерапией. В условиях же приме-

нения рунихола параметры фагоцитоза пМф не изменялись по отношению к таковым в группе мышей, получавших только резервные ПТП.

### Список литературы

1. *Александрова А.Е., Ариэль Б.М.* Оценка тяжести туберкулезного процесса в легких мышей // Пробл. туб. — 1993. — №3. — С. 52-53.
2. *Банержи А.* Медицинская статистика понятным языком. — М.: Практическая медицина, 2007. — 287 с.
3. *Васильева И.А., Самойлова А.Г., Багдасарян* и др. Зависимость результатов лечения больных туберкулезом легких от спектра лекарственной устойчивости возбудителя // Туберкулез и болезни легких. — 2011. — №10. — С. 28-32.
4. *Витовская М.Л.* Оценка эффективности сухого экстракта из слоевищ цетрарии исландской (ислацета) в терапии генерализованного туберкулеза (экспериментальное исследование): Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — СПб., 2005. — 23 с.
5. *Лядова И.В., Гергерт В.Я.* Реакции Т-клеточного иммунитета при туберкулезе: экспериментальные и клинические исследования // Проблемы туберкулеза. — 2009. — №11. — С. 9-18.
6. *Романцов М.Г., Мельникова И.Ю.* Возможности использования циклоферона при вирусных и бактериальных инфекциях у детей. Интерферон 2011. Сборник научных статей (к 80-летию академика РАМН Ф.И. Ершова). — М., 2012. — С. 232-252.
7. *Суханов Д.С., Виноградова Т.И., Заболотных Н.В.* и др. Сравнительное изучение гепатопротективного действия ремаксола, реамберина и адеметионина при повреждении печени противотуберкулезными препаратами // Антибиотики и химиотерапия. — 2011. — Т. 56, №1. — С. 13-18.
8. *Easton D.M., Nijnik A., Hancock R.E.W.* Potential of immunomodulatory host defense peptides as novel anti-infectives // Trends in Biotechnology. — 2009. — Vol. 27, №10. — P. 582-590.

Поступила 03.12.12

### Сведения об авторах:

*Виноградова Татьяна Ивановна*, д-р мед. наук, проф., рук. лаб. экспериментального туберкулеза и новых медицинских технологий ФГБУ «СПбНИИФ» Минздрава РФ

*Демидик Светлана Николаевна*, ассистент каф. фтизиопульмонологии и профпатологи УО ГрГМУ Минздрава РФ

*Заболотных Наталья Вячеславовна*, д-р мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. экспериментального туберкулеза и новых медицинских технологий ФГБУ «СПбНИИФ» Минздрава РФ

*Васильева Светлана Николаевна*, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. экспериментального туберкулеза и новых медицинских технологий ФГБУ «СПбНИИФ» Минздрава РФ

*Коваленко Алексей Леонидович*, д-р биол. наук, дир. по науке ООО «НТФФ «ПОЛИСАН»

*Витовская Мария Львовна*, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. экспериментального туберкулеза и новых медицинских технологий ФГБУ «СПбНИИФ» Минздрава РФ

О.В. Калинина<sup>1</sup>, Е.С. Колотова<sup>2</sup>, Т.В. Панфилова<sup>1</sup>, А.А. Штиль<sup>2</sup>, Б.А. Фролов<sup>1</sup>

## **Природный тритерпеноид милиацин предотвращает вызванный метотрексатом окислительный стресс и нормализует экспрессию генов сур-2e1 и глутатионредуктазы в печени**

<sup>1</sup> Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Оренбургская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, 460000, Оренбург, ул. Советская, 6

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина»

Российской академии медицинских наук, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

*Изучено влияние тритерпеноида растительного происхождения милиацина (3-β-метокси-Δ<sup>18</sup>-олеанена) на индукцию окислительного стресса в печени мышей (CBAxС<sub>5</sub>7B1<sub>6</sub>)F<sub>1</sub>, подвергнутых воздействию метотрексата, и определена роль изоформы 2E1 цитохрома P-450 (сур-2e1) и глутатионредуктазы (glu red) в защитном действии тритерпеноида по оценке экспрессии генов, кодирующих указанные белки. Подтверждена способность метотрексата индуцировать окислительный стресс, сопровождающийся статистически достоверным накоплением в печени ТБК-реагирующих продуктов, и установлена способность тритерпеноида лимитировать этот процесс. Методом ПЦР после обратной транскрипции установлено увеличение количества мРНК сур-2e1 под влиянием метотрексата. Обнаружена конститутивная экспрессия glu red у интактных мышей, ингибируемая метотрексатом. Милиацин ослаблял или полностью отменял эффекты метотрексата на экспрессию указанных генов. Результаты исследования раскрывают новые аспекты протективного влияния милиацина, связанные с участием тритерпеноида в регуляции редокс-баланса клетки на геномном уровне.*

**Ключевые слова:** метотрексат, милиацин, повреждение печени, окислительный стресс, регуляция экспрессии генов

O.V. Kalinina<sup>1</sup>, E.S. Kolotova<sup>2</sup>, T.V. Panfilova<sup>1</sup>, A.A. Shtil<sup>2</sup>, B.A. Frolov<sup>1</sup>

## **The natural triterpenoid miliacin prevents methotrexate-induced oxidative stress and normalizes the expression of genes encoding the cytochrome P-450 2E1 isoform and glutathione reductase in the liver**

<sup>1</sup> N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the RAMS, 24, Kashirskoye hwy., Moscow, 115478, Russia

<sup>2</sup> The Orenburg State Medical Academy, 6, Soviet str., Orenburg, 460000, Russia

*We studied the role of the natural triterpenoid miliacin (3-β-methoxy-Δ<sup>18</sup>-oleanene) in the regulation of oxidative stress in the liver of (CBAxС<sub>5</sub>7B1<sub>6</sub>)F<sub>1</sub> mice exposed to methotrexate. Miliacin attenuated methotrexate-induced lipid peroxidation as determined by an attenuation of thiobarbituric acid-reacting products in the liver. Furthermore, miliacin normalized the expression of genes encoding the 2e1 isoform of cytochrome P-450 and glutathione reductase that were dramatically dysregulated by methotrexate. These results established the role of miliacin in modulation of redox genes, thereby providing evidence for a new mechanism of organ protection by this triterpenoid.*

**Key words:** methotrexate, miliacin, liver toxicity, oxidative stress, gene regulation

Метотрексат (МТ) — высокоэффективный препарат, используемый в лечении злокачественных новообразований, тяжелых форм псориаза и ревматоидного артрита [7]. Использование в терапевтических режимах предусматривает длительное применение и нередко эскалацию доз МТ. В свою очередь, это сопровождается

общерезорбтивной токсичностью, что обуславливает необходимость поиска органопротекторов для комбинирования с МТ. Ранее установлено, что тритерпеноид растительного происхождения милиацин ограничивает гепатотоксичность МТ [4], не влияя на его фармакокинетику [5] и противоопухолевую эффективность [6]. Известно, что токсичность МТ для клеток печени связана с индукцией окислительного стресса [21, 26], в основе которого лежит интенсификация свободнорадикального окисления биомолекул, обусловленная генерацией ак-

**Для корреспонденции:** Калинина Ольга Вячеславовна, асс. каф. патологической физиологии ГБОУ ВПО ОрГМА Минздрава РФ. E-mail: olgakalina78@mail.ru

тивных форм кислорода (АФК) и нарушением баланса про- и антиоксидантных систем клетки [13]. К важнейшим прооксидантам относится изоформа сур-2e1 цитохрома P-450 (цх P-450) — один из механизмов индукции окислительного стресса [20]. Напротив, ведущим функциональным звеном антиоксидантной защиты клеток являются низкомолекулярные тиолы, среди которых центральное место принадлежит восстановленному глутатиону — «катализатору тиолдисульфидного обмена» [8]. Поддержание внутриклеточного уровня восстановленного глутатиона обеспечивается глутатионредуктазой (*glu red*) [15].

*Цель работы* — изучение влияния милациина на индукцию окислительного стресса в печени животных, подвергнутых воздействию МТ, а также выяснение роли сур-2e1 и *glu red* в реализации защитного эффекта тритерпеноида по оценке экспрессии генов, кодирующих указанные белки.

### Методика

Исследования проведены на мышках-самцах (СВАхС<sub>5</sub>7В1<sub>6</sub>)F<sub>1</sub> массой 18—22 г из питомника РАМН «Столбовая». Использованы МТ (фирма «Эбеве», Австрия) и милацин, полученный из кристаллов просяного масла, выпадающих при его отстаивании на холоду с последующей перекристаллизацией из хлороформа. На основании данных ЯМР-, ИК- и масс-спектроскопии, а также хроматографии милацин отнесен к группе пентациклических тритерпенов, имеющих структуру 3-β-метоксигерманицена (3-β-метокси-Δ<sup>18</sup>-олеанена) [11].

Эксперименты выполнены на 41 животном. Мыши были разделены на 6 групп: интактную и 5 опытных. В 1-ю опытную группу включены животные, получавшие растворитель милациина твин-21 (конечная концентрация 1,6×10<sup>-7</sup> моль/кг) внутрибрюшинно 3-кратно (ежедневно в течение 3 сут.); во 2-ю — мыши, получавшие милацин 3-кратно в разовой дозе 2 мг/кг; в 3-ю — мыши после 1-кратного внутрибрюшинного введения МТ (10 мг/кг); группы 4-ю и 5-ю составили мыши после 1-кратного введения МТ с последующим (через 1, 24 и 48 ч) 3-кратным введением твина-21 или милациина, соответственно. Животных выводили из эксперимента на 4-е сут после инъекции МТ с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Маркером окислительного стресса служили продукты окисления, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой — ТБК-реагирующие продукты (ТБК-РП) [31]. ТБК-РП в гомогенатах печени животных выявляли с использованием стандартных реактивов ТБК — АГАТ («Агат-Мед», Россия). Интенсивность цветной реакции определяли на спектрофотометре АРЕL РD-303 UV при длинах волн 535 нм и 570 нм. Расчет ТБК-РП проводили в молях

на 1 г общих липидов (о.л.). Концентрацию о.л. определяли спектрофотометрически с использованием реактивов «Lachema» (Чехия).

Влияние милациина на экспрессию генов *сур-2e1* и *glu red* в печени животных, подвергнутых действию МТ, изучали на 28 мышках F<sub>1</sub>, разделенных на 4 группы (по 7 животных в группе):

- 1 — интактные животные;
- 2 — мыши, подвергавшиеся действию МТ (10 мг/кг);
- 3 — мыши, получавшие МТ с последующим 3-кратным введением твина-21;
- 4 — мыши, получавшие МТ с последующим 3-кратным введением милациина.

Образцы печени, как и в предыдущей серии, анализировали на 4-е сут. после введения МТ. Печень извлекали немедленно после выведения мышей из эксперимента, гомогенизировали в жидком азоте и добавляли 1 мл реагента TRIzol (Invitrogen, США). К лизату добавляли хлороформ (0,2 мл), встряхивали и центрифугировали 10 мин при 12 000 об/мин. К водной фазе добавляли равный объем 2-пропанола, инкубировали 10 мин при комнатной температуре и центрифугировали 10 мин при 12 000 об/мин. Осадок (тотальная клеточная РНК) промывали 0,5 мл 70%-ного водного этанола и растворяли в 50 мкл воды. Получали кДНК в реакции обратной транскрипции (реактивы Fermentas, Литва) с «случайными» гексануклеотидами («Хеликон», Россия). Пробы инкубировали 10 мин при комнатной температуре, затем 50 мин при 42°C и 15 мин при 70°C. Экспрессию генов *сур-2e1* и *glu red* определяли в полимеразной цепной реакции (ПЦР). Праймеры синтезированы фирмой «Хеликон» (Россия) (табл.1), остальные реактивы приобретены в фирме Fermentas. ПЦР проводили на ДНК-амплификаторе «Терцик» («ДНК-технологии», Россия) по следующей схеме: денатурация для первого цикла — 1 мин (94°C), для каждого последующего — 10 с (94°C), отжиг праймеров — 10 с (60°C), элонгация — 30 с (72°C). Число циклов ПЦР установлено в предварительных опытах по линейному приращению продуктов реакции (24—27 циклов; табл. 1) Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле (0,5 М трис-боратный буфер, рН 8,0). Гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолетовом свете. Экспрессию генов *сур-2e1* и *glu red* определяли по выраженности полосы ПЦР, соответствующей тому или иному продукту. В качестве контроля генной экспрессии использовали кДНК глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*gapdh*).

Достоверность различий между средними величинами оценивали с использованием непараметрического метода Манна—Уитни [2]. Статистически достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

Праймеры, использованные в ПЦР. Для каждого гена: верхняя строка — прямой праймер, нижняя — обратный

Ген	Нуклеотидные последовательности	Количество циклов
<i>cyp 2E1</i>	5'-CATCACCGTTGCTTGCTTG-3' 5'-GCCAACTTGGTTAAAGACTTGGG-3'	27
<i>glu red</i>	5'-GCGGCGCGCGCGCTCACC-3' 5'-GCGCCGAGCTCCGCCGCCCGC-3'	24
<i>gapdh</i>	5'-ACTGGCGTCTTCACCACCAT-3' 5'-TGTTGGCATGGACTGTGGTC-3'	24

### Результаты и обсуждение

Установлено (рис. 1), что введение твина-21 (группа 2) или милацина (группа 3) не влияло на содержание ТБК-РП в печени по сравнению с интактными животными (группа 1). МТ (группа 4) вызывал значительное (в среднем в 5,7 раза) накопление ТБК-РП: с  $0,11 \pm 0,015$  мкмоль/г о.л. до  $0,63 \pm 0,023$  мкмоль/г о.л. Твин-21 (группа 5) не отменял этот эффект МТ: уровень ТБК-РП у данной группы превышал таковой у интактных мышей в 5,4 раза, составляя  $0,59 \pm 0,046$  мкмоль/г о.л. В противоположность этому, применение милацина в комбинации с МТ (группа 6) существенно снижало содержание ТБК-РП в печени животных до уровня ( $0,16 \pm 0,010$  мкмоль/г о.л.), близкого к таковому у интактных мышей.

Конститутивная экспрессия гена изоформы цх Р450 *cyp-2e1* (рис. 2А) у интактных животных (К) не выявлена. МТ вызывал значительную индукцию *cyp-2e1* у всех особей. Твин-21 (МТ+Т) не отменял МТ-индуцированное накопление мРНК *cyp-2e1* ни в одном случае. Напротив, применение милацина на фоне МТ (МТ+М) подавляло индуцированную экспрессию *cyp-2e1* у 6 мышей (пробы 1—6) и заметно ослабляло у 1 особи (проба 7). Сам милацин не влиял на уровень мРНК *cyp-2e1*. Экспрессия контрольного гена *gapdh* не изменялась (рис. 2А, нижняя панель).

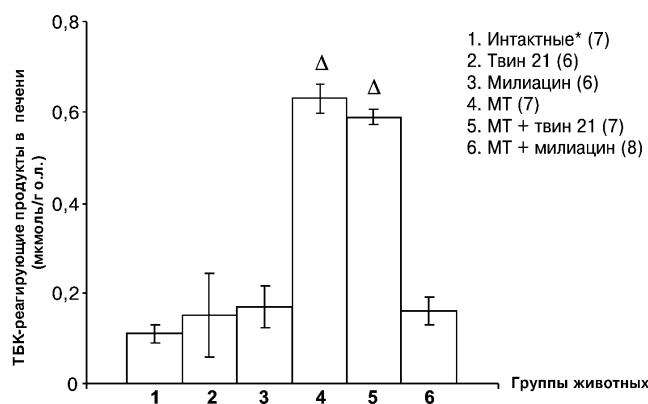


Рис. 1. Влияние метотрексата и милацина на количество ТБК-реагирующих продуктов в печени мышей (СВА x C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub>)F<sub>1</sub>: р<0,05 к группам 1, 2, 3, 6; \* в скобках — количество животных в группе

Иная закономерность обнаружена при изучении экспрессии гена *glu red* (рис. 2Б). У интактных мышей этот ген экспрессирован (К). МТ полностью подавлял экспрессию *glu red* у всех животных исследуемой группы. Твин-21 (МТ+Т) не отменял ингибирующего влияния МТ на экспрессию *glu red*. Милацин не влиял на уровень мРНК *glu red* (данные не приводятся). Важно, что милацин (МТ+М) ограничивал вызванное МТ подавление экспрессии *glu red*, полностью восстанавливая экспрессию этого гена у двух животных (пробы 1, 2) и частично — еще у трех (пробы 3—5). Экспрессия *gapdh* оставалась одинаковой (рис 2А, нижняя панель).

Полученные результаты позволяют высказать три положения. Во-первых, подтверждена способность МТ индуцировать окислительный стресс в печени, сопровождающийся значительным накоплением ТБК-РП [21, 26], основным компонентом которых является малоновый диальдегид [1]. Последний, будучи продуктом перекисного окисления липидов (ПОЛ), отражает интенсивность этого процесса и, следовательно, интенсивность окислительного стресса [18]. Во-вторых, отмена милацином МТ-индуцированного накопления ТБК-РП в печени указывает на способность тритерпеноида ограничивать активацию ПОЛ и окислительную модификацию биомолекул.

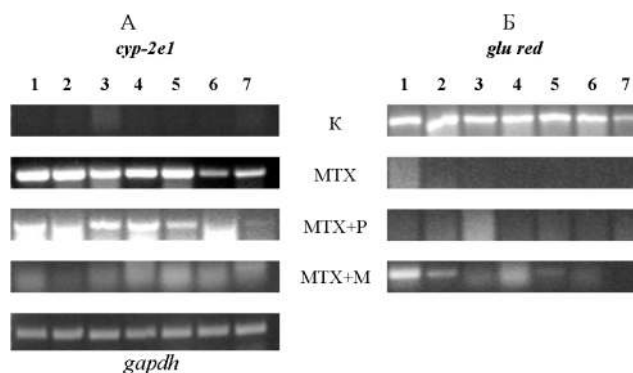


Рис. 2. Влияние метотрексата и милацина на экспрессию генов *cyp-2e1* (А) и *glu red* (Б) в печени мышей (СВА x C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub>) F<sub>1</sub>: М — милацин; МТ — метотрексат; Т — твин-21. Пояснения в тексте.



В-третьих, полученные данные свидетельствуют о том, что индукция окислительного стресса при действии МТ и гепатопротекторное влияние милацицина реализуются в условиях разнонаправленных изменений экспрессии генов *сур-2e1* и *glu red*, продукты которых регулируют окислительно-восстановительный баланс клетки.

Поскольку антиоксидантная активность милацицина, проявляющаяся ингибированием ПОЛ, установлена нами ранее на модели комбинированного стресса у мышей СВАхС<sub>5</sub>7В1<sub>6</sub>)F<sub>1</sub> [12], приоритетное значение приобретает вопрос о связи этого эффекта три-терпеноида с изменениями экспрессии редокс-генов. При оценке механизмов влияния МТ на экспрессию *сур-2e1* следует учитывать, что МТ не относится к ксенобиотикам, биотрансформация которых связана с участием монооксигеназ цх Р-450 [16, 25]. Образование активного метаболита МТ — 7-гидрокси-МТ [7] — в гепатоцитах происходит при участии растворимых цитозольных ферментов: альдегидоксидазы и ксантинооксидазы [23]. Незначительна и способность МТ к модуляции экспрессии изоформ *сур* в печени. В культуре гепатоцитов МТ вызывал лишь слабые изменения экспрессии *сур-3a4* [19, 30], *сур-3a2* [22], *сур-2b6* [24] и незначительную активацию ядерных рецепторов PXR (pregnen-X receptor) — факторов транскрипции генов *сур-2* и *сур-3* [17]. Эти данные исключают микросомальное окисление МТ как причину нарастания мРНК *сур-2e1*.

Более вероятным представляется механизм, связанный с увеличением мРНК *сур-2e1* под влиянием АФК. Образование 7-ОН-МТ в ходе ферментативных реакций с участием оксидаз сопряжено с генерацией АФК, способных индуцировать *сур-2e1*. Такое предположение расходится с представлениями об ингибирующем эффекте АФК на продукцию и активность микросомальных монооксигеназ [9, 14]. Однако регуляторное влияние АФК на генную экспрессию определяется их концентрацией и состоянием молекулярных систем, подвергающихся воздействию АФК [13, 15]. В связи с этим следует считать, что роль АФК в регуляции цх Р-450 не только негативная. Такое утверждение подтверждается и фактом увеличения мРНК ряда изоформ цх Р-450, включая *сур-2e1*, при острофазовом ответе [14], сопряженном с образованием АФК [10].

Влияние МТ на экспрессию гена *glu red* в печени, вероятно, носит двойственный характер. Известно, что индукция *сур-2e1* и генерация АФК активируют фактор транскрипции Nrf 2 (nuclear respiratory factor), играющий ключевую роль в адаптивном ответе клетки на окислительный стресс [20]. Транслокация Nrf 2 в ядро и его связывание с сайтом ARE (antioxidant responsive element) в промоторах генов антиоксидантной

защиты, включая *glu red*, служит механизмом их активации. Вместе с тем, накапливающиеся при окислительном стрессе АФК и продукты липопероксидации, в частности, альдегиды, обладают выраженным генотоксическим действием [3], что приводит к угнетению генной экспрессии. Исходя из полученных результатов, можно полагать, что в отношении *glu red* преобладает генотоксический эффект, приводящий к подавлению его экспрессии в ответ на МТ. Восстановление экспрессии *glu red* в комбинации милацицин + МТ могло определяться, по меньшей мере, двумя обстоятельствами: снижением выраженности окислительного стресса и, соответственно, генотоксичности и (или) прямым влиянием милацицина на Nrf 2, подобно тому, которое было установлено для синтетического аналога олеаноловой кислоты CDDO<sup>1</sup> [32].

Снижение экспрессии *сур-2e1* под влиянием милацицина в печени животных, подвергшихся воздействию МТ, по-видимому, отражает способность три-терпеноидов к избирательному ингибированию отдельных изоформ цх Р-450. Аналогичный эффект в отношении *сур-2e1* — снижение его содержания и активности в печени мышей с СС1<sub>4</sub>-индуцированной гепатотоксичностью — отмечен при применении олеаноловой и β-глицерритиновой кислот [28]. Подавление активности белков *сур-1a2*, *сур-3a4* и *сур-2c19* показано при действии олеаноловой и уросоловой кислот [29]. При этом отдельные изоформы монооксигеназ проявляют избирательную чувствительность к конкретным три-терпеноидам, о чем свидетельствует снижение в гепатоцитах мРНК *сур 1a 1/2* и *сур 2b 1/2*, но не *сур 2e1*, под влиянием альфа-гедерина [27]. Можно предположить, что механизм подобного влияния обусловлен конкурентным связыванием три-терпеноидов с факторами транскрипции и (или) с активными центрами монооксигеназ.

Обобщая полученные данные, необходимо отметить, что установленная ранее способность милацицина ограничивать окислительный стресс связывалась с мембраностабилизирующим действием три-терпеноида — повышением устойчивости мембран к АФК-индуцируемой липопероксидации [12]. Результаты настоящей работы раскрывают новые аспекты протективного влияния милацицина, связанные с его участием в регуляции редокс-баланса клетки путем отмены МТ-индуцированной экспрессии гена прооксидантного белка *сур-2e1* и восстановления экспрессии гена, кодирующего один из ведущих факторов антиоксидантной защиты — *glu red*.

<sup>1</sup> CDDO — 2-циано-3,12-диоксиолеан-1,9-диен-28-оидная кислота.

## Список литературы

1. *Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кишкун А.А.* Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лабораторное дело. — 1988. — №11. — С. 41-43.
2. *Гублер Е.В., Генкин А.А.* Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л.: Медицина, 1973. — 141 с.
3. *Дубинина Е.Е., Дадали В.А.* 4-гидрокси-транс-2-нонeналь в функциональной активности клеток // Биохимия. — 2010. — Т. 75. — Вып. 9. — С. 1189-1212.
4. *Калинина О.В., Красиков С.Т., Шехтман А.М.* и др. Гепатопротекторное действие мелиацина при токсическом поражении печени метотрексатом // Росс. биотер. журн. — 2009. — Т. 8, №1. — С. 48-54.
5. *Калинина О.В., Сингин А.С., Фролов Б.А.* и др. Изучение фармакокинетики метотрексата в комбинации с органопротектором мелиацином // Вестн. РОНЦ. — 2009. — Т. 20, №4. — С. 33-37.
6. *Калинина О.В., Фролов Б.А., Штиль А.А.* и др. Влияние мелиацина на противоопухолевую активность метотрексата на модели перевиваемой карциномы легких Льюис // Росс. биотер. журн. — 2009. — Т. 8, №4. — С. 45-48.
7. Клиническая фармакология по Гудману и Гилману. Кн. 3-я / Под общ. ред. А.Г. Гилмана, ред. Дж. Хардман и Л. Лимберд. В 4-х томах / Пер. с англ. — М.: Практика, 2006. — С. 1079-1083.
8. *Кулинский В.И., Колесниченко Л.С.* Биологическая роль глутатиона // Усп. совр. биол. — 1990. — Т. 110. — Вып. 1(4). — С. 20-33.
9. *Ланкин В.З., Тихадзе А.К., Беленков Ю.Н.* Свободнорадикальные процессы в норме и при заболеваниях сердечно-сосудистой системы. — М., 2000. — 69 с.
10. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания / Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. и др. — Новосибирск: АРТА, 2008. — 284 с.
11. *Олифсон Л.С., Осаочая Н.Д., Нузов Б.Г.* и др. Химическая природа и биологическая активность мелиацина // Вопр. пит. — 1991. — №2. — С. 57-59.
12. *Панфилова Т.В., Штиль А.А., Фролов Б.А.* Тритерпеноид мелиацин снижает индуцируемое стрессом ПОЛ // Бюлл. эксп. биол. мед. — 2006. — С. 633-635.
13. *Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В.* Значение баланса прооксидантов и антиоксидантов — равнозначных участников метаболизма // Пат. физиол. эксп. тер. — 2007. — №3. — С. 2-18.
14. *Сибиряк С.В., Вахитов В.А., Курчатова Н.Н.* Цитохром P 450 и иммунная система. — Уфа: Гилем, 2003. — 211 с.
15. *Турпаев К.Т.* Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов (обзор) // Биохимия. — 2002. — Т. 67. — Вып. 3. — С. 339-353.
16. *Филимонова А.А., Зиганин А.У., Зиганина Л.С.* Особенности метаболизма разных лекарственных средств с участием изоферментов цитохрома P-450 // Эксп. клин. фармакол. — 2007. — Т. 70, №3. — С. 69-77.
17. Цитокиновая регуляция биотрансформации ксенобиотиков и эндогенных соединений / Сибиряк С.В., Черешнев В.А., Симбирцев А.С. и др. — Екатеринбург: УрО РАН, 2006. — С. 160.
18. *Шилова И.В., Жаворонок Т.В., Суслов Н.И.* и др. Гепатозащитные свойства фракции экстракта лабазника вязолистного при экспериментальном токсическом гепатите // Бюлл. эксп. биол. мед. — 2008. — Т. 146, №7. — С. 54-57.
19. *Baumhake M., Rasel D., Rao-Schymanski R.A.* et al. Screening for inhibitory effects of antineoplastic agents on CYP 3A4 in human liver microsomes // Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. — 2001. — Vol. 39, №12. — P. 517-528.
20. *Cederbaum A.I.* Nrf 2 and antioxidant defense against CYP2 E1 toxicity // Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. — 2009. — Vol. 5, №10. — P. 1223-1244.
21. *Cetinkaya A., Bulbuloglu E., Kurutas E.B., Kantarceken B.* N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats // Med. Sci. Monitor. — 2006. — Vol. 12, №8. — P. 274-278.
22. *Cheung R.L., Lee C., Jones E.J.* et al. Lack of effect of methotrexate on the expression of constitutive hepatic cytochromes P-450 in the male rat // Xenobiotica. — 1996. — Vol. 26, №5. — P. 503-514.
23. *Chladek J., Martinkova J., Sispera L.* An in vitro study on methotrexate hydroxylation in rat and human liver // Physiol. Res. — 1997. — Vol. 46, №5. — P. 371-379.
24. *Faucette S.R., Wang H., Hamilton G.A.* et al. Regulation of CYP2 B6 in primary human hepatocytes by prototypical inducers // Drug Metab. Dispos. — 2004. — Vol. 32, №3. — P. 348-358.
25. *Guillon J., Souillet G., Riviere J.L.* et al. Action of methotrexate on cytochrome P-450 monooxygenases in rats. Study performed with [13C]-aminopyrine micro breath test // Eur. Drug Metab. Pharmacokinet. — 1994. — Vol. 19, №2. — P. 119-124.
26. *Hemeida R.A.* Curcumin attenuates methotrexate-induced hepatic oxidative damage in rats / R.A. Hemeida, O.M. Mohafez // J. Egypt. Natl. Canc. Inst. — 2008. — Vol. 2. — P. 141-148.
27. *Jeong H.G.* Suppression of constitutive and inducible cytochrome P-450 gene expression by alpha-hederin in mice // Biochem. Mol. Biol. Int. — 1998. — Vol. 46, №5. — P. 1019-1026.
28. *Jeong H.G., You H.J., Park S.J.* et al. Hepatoprotective effects of 18 beta-glycyrrhetic acid on carbon tetrachloride-induced liver injury: inhibition of cytochrome P-450 2E1 expression // Pharmacol. Res. — 2002. — Vol. 46, №3. — P. 221-227.
29. *Kim K.A., Lee J.S., Park H.Y.* et al. Inhibition of cytochrome P-450 activities by oleanolic acid and ursolic acid in human liver microsomes // Life Sci. — 2004. — Vol. 74, №22. — P. 2769-2779.
30. *Luo G., Cunningham H., Kim S.* et al. CYP 3A4 induction by drugs: correlation between a pregnan X receptor reporter gene assay and CYP 3A4 expression in human hepatocytes // Drug Metab. Dispos. — 2002. — Vol. 30, №7. — P. 795-804.
31. *Vincent H.K., Innes K.E., Vincent K.R.* Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity // Diabetes, Obesity Metab. — 2007. — Vol. 9, №6. — P. 813-839.
32. *Yates M.S., Tran Q.T., Dolan P.M.* Genetic versus chemoprotective activation of Nrf2 signaling: overlapping yet distinct gene expression profiles between Keap1 knockout and triterpenoid treated mice // Carcinogenesis. — 2009. — Vol. 30, №6. — P. 1024-1031.

Поступила 28.10.11

## Сведения об авторах:

*Колотова Екатерина Сергеевна*, мл. науч. сотр. лаб. механизмов гибели опухолевых клеток НИИ канцерогенеза ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН  
*Панфилова Татьяна Владимировна*, канд. мед. наук., доц. каф. патологической физиологии ГБОУ ВПО ОрГМА Минздрава РФ  
*Штиль Александр Альбертович*, д-р мед. наук, зав. лаб. механизмов гибели опухолевых клеток НИИ канцерогенеза ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН  
*Фролов Борис Александрович*, д-р мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии ГБОУ ВПО ОрГМА Минздрава РФ

Ю.А. Меркулов<sup>1,2</sup>, А.А. Пятков<sup>1,2</sup>, Д.М. Меркулова<sup>1,2</sup>

## **Работа с ночными сменами как фактор дизрегуляции вегетативной нервной системы у машинистов локомотивов**

<sup>1</sup> Неврологический центр им. Б.М. Гехта, Негосударственное учреждение здравоохранения Центральная клиническая больница №2 им. Н.А. Семашко Департамента здравоохранения Открытого акционерного общества «Российские железные дороги», 107150, Москва, ул. Лосиноостровская, вл. 43

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

*Работа с ночными сменами является обязательной необходимостью современной части индустриального урбанизированного общества. В развитых странах в работе, связанной с ночными сменами, задействовано до 20% населения. К таким категориям трудящихся, безусловно, относятся машинисты локомотивов. Следствием регулярной работы с ночными сменами является нарушение циркадных ритмов человека, что, посредством дизрегуляции вегетативной нервной системы, находит отражение в большем риске возникновения заболеваний и аварийности на транспорте. Необходимость поиска способов и критериев превентивного мониторинга дизрегуляторных изменений в организме человека является актуальной и перспективной проблемой с точки зрения сохранения здоровья трудоспособного населения, профилактики заболеваний и обеспечения безопасности на транспорте.*

**Ключевые слова:** ночные смены, циркадные ритмы, дизрегуляция, машинисты, вариабельность ритма сердца, вегетативная нервная система

Y.A. Merkulov<sup>1,2</sup>, A.A. Pyatkov<sup>1,2</sup>, D.M. Merkulova<sup>1,2</sup>

## **Work with night shift as a factor dysregulation of autonomic nervous system of locomotive drivers**

<sup>1</sup> Gekht neurological center, N.A. Semashko Central clinical hospital №2 OAO «RZhD», 43, Losinoostrovskaya str., 107150, Russia

<sup>2</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

*Work with night shift is an obligate necessity of modern industrial urban society. In developed countries in the work on the night shift use up to 20%. These categories of workers are definitely the locomotive drivers. The consequence of a regular work with night shifts is a violation of human circadian rhythms, which, through dysregulation of the autonomic nervous system, is reflected in a greater risk of disease and transport accidents. The need to find ways and criteria of preventive monitoring dysregulatory changes in the human body is an urgent and challenging issue in terms of the health of the working population, disease prevention, and transportation security.*

**Key words:** night shifts, circadian rhythms, dysregulation, machinists, heart rate variability, autonomic nervous system

Эволюционно закрепленная последовательность взаимодействия различных физиологических систем согласована с внешней средой и определяет нормальную жизнедеятельность целостного организма. Ведущим условием существования большинства живых существ является необходимость поддержания гомеостаза в условиях меняющихся воздействий внешней и внутренней среды. В статье «Пути развития космической физиологии» академик В.В. Парин отмечает: «Только глубоко изучив механизмы регуляции и компенсации

функций организма, можно управлять ими и тем самым обеспечивать гомеостаз организма» [14].

Постоянное уравнивание организма со средой требует непрерывной перенастройки внутренних связей между физиологическими системами, изменения их активности, регулирования и функционирования [3]. Рассогласование упорядоченной работы физиологических систем с внешней средой способно приводить к адаптационно-приспособительным нарушениям посредством стойких дизрегуляторных каскадов [5]. Эти процессы, описанные Г.Н. Крыжановским, обозначаются как дизрегуляторная патология и являются следствием длительно существующей активности патологических функциональных систем, способных впоследствии формировать нозологические характеристики болезни.

**Для корреспонденции:** Пятков Артем Александрович, мл. науч. сотр. лаб. патологии ионного транспорта и внутриклеточной сигнализации ФГБУ «НИИОПП» РАМН, врач-невролог НЦ им. Б.М. Гехта, ЦКБ №2 им. Н.А. Семашко ОАО «РЖД». E-mail: contradolor@mail.ru

Вместе с тем, развитию дизрегуляторной патологии предшествует ряд изменений функций организма — дизрегуляция, которая, по определению Г.Н. Крыжановского, является неспецифическим ответом организма как реакция на персистенцию разнообразных неблагоприятных факторов. Таковыми могут быть хронические соматические заболевания, инфекции, аллергические реакции, непропорционально высокие физические нагрузки, эмоциональный стресс и т.д. При этом в литературе нет описания однозначных критериев того, какие изменения в модели регуляции функций являются физиологическими, определяющими адаптацию организма, а какие имеют тенденцию к развитию дизрегуляции; какие именно механизмы можно рассматривать как переходные и индикаторные в процессе от дизрегуляции к дизрегуляторной патологии.

Одним из ключевых факторов дизрегуляции в современном обществе является облигатная необходимость работы больших слоев населения в ночное время, что приводит к нарушению привычных циркадных ритмов человека.

С ночными сменами в развитых странах занято порядка 20% работающего населения. Официальной ночной сменой считается смена с 22.00 до 6.00 и близкие варианты 23.00—7.00 и 24.00—8.00 ч (ст. 96 ТК РФ). Некоторые предприятия вводят свое понимание ночной смены. Например, метрополитен считает ночной смену, начинающуюся от 16.00 до 18.00 и оканчивающуюся в 24.00 и 02.00; затем ночной отдых, утром работа с 5.00 и 6.00 до 8.30 и 9.30.

Традиционно большое внимание уделяется этой проблеме в железнодорожной медицине. В работах А.З. Цфасмана подробно описываются особенности гигиены труда у машинистов электровозов при работе с ночными сменами. Сон днем после ночной смены, по данным А.З. Цфасмана, большей частью короток и неполноценен, работающий с ночными сменами в среднем недосыпает за неделю не менее 5—7 часов [18]. Артериальное давление у машинистов имеет тенденцию к повышенным значениям, в том числе с недостаточностью его снижения в ночное время, что косвенно говорит о преобладании симпатических влияний в регуляции работы сердечно-сосудистой системы [19].

Адаптация к работе (бодрствование по ночам), ее скорость и степень во многом связаны с индивидуальными особенностями. Только 1/5 работающих по ночам адаптируются почти полностью, а у остальных адаптации не происходит и после года работы в ночные смены. При этом есть сведения, указывающие на легкую переносимость и адаптацию отдельных лиц к постоянной ночной работе [10].

Следует подчеркнуть, что переносимость работы в ночную смену и вообще бодрствования по ночам, осо-

бенности приспособления к измененному суточному графику жизнедеятельности во многом определяется генетическими факторами. Известна классификация на «сов» и «жаворонков», каждый из которых имеет свои «предпочтения» относительно физической и умственной активности в различные периоды суток. Такие особенности детерминированы определенными генами, являются стойкими, малокорректируемыми на протяжении жизни и/или трудовой деятельности. В связи с этим возникает вопрос о необходимости проведения психофизиологического и генетического тестирования для кандидатов на работу, связанную с ночными сменами и высокой социальной ответственностью с целью сохранения здоровья сотрудника и обеспечения безопасности на рабочем месте.

У лиц, работающих в разные смены (в дневные и ночные), происходит десинхронизация наружных сигналов — сигнализаторов ритма, причем природные сигналы не меняются, а социальные сдвигаются в зависимости от смены. Трудности адаптации в особенности заметны в первый день после изменения смены, однако эти трудности могут иметь тенденцию к уменьшению в последующие дни в процессе приспособления к новому ритму. Однако необходимо отметить, что истинного изменения всех ритмов иногда не происходит даже у лиц, постоянно работающих в ночные смены, потому что социальные аспекты (в дополнение к природным) остаются синфазными местному времени — повседневная деятельность членов семьи, телевизионные программы, культурная жизнь, уличный шум [10].

Относительная стойкость временной последовательности функций обеспечивается эволюционно детерминированной ассоциацией этих функций с 24-часовым внешним ритмом, что определяет «внутренние часы» человека. История учения о биологических часах простирается на несколько веков. Еще в 1729 г. французский ученый де Меран, проводя наблюдения над растениями, сделал предположение о существовании особых внутренних биоритмов на основе наблюдений за «никтинастическими» движениями листьев особого сорта фасоли. В настоящее время в общем виде, биоритмы можно классифицировать по временному критерию (Hallberg, 1964). Выделяют биоритмы с периодом от нескольких долей секунд до нескольких десятков лет и более. Но наиболее важными и изученными для человека являются циркадианные (или циркадные) ритмы, период которых составляет около 24 ч. Например, цикл «сон — бодрствование». В рамках этого цикла известно закономерное нормальное изменение температуры тела в течение суток со снижением температуры в период сна и возрастанием ее на фоне бодрствования; колебания уровня кортизола в крови также с низкими значениями во время сна и увеличением в утренние часы в начале бодрствования.

Наряду с бурным ростом медицинских знаний, основанных на доказательствах, в последнее десятилетие интенсивно развиваются исследования, базирующиеся на закономерностях хронобиологии и хрономедицины [10, 19]. Планомерное развитие хронобиологии и хрономедицины за последние 50 лет позволило внедрить в практическую медицину холтеровское мониторирование, суточный мониторинг АД, 24-часовой мониторинг кислотности пищевода и желудка. Доказана возможность почти в два раза более эффективного, более быстрого и более безопасного лечения кардиологических пациентов с учетом принципов хрономедицины [8, 19]. Достигнуты значительные успехи в хроноонкологии и биоритмологическом биоуправлении. Внедрение хронобиологически обоснованных методов позволяет выявить предшественники болезней на донологическом уровне у лиц без клинически значимых симптомов болезни [3].

Основным регуляторным инструментом в механизме поддержания постоянства внутренней среды и адекватности адаптационных реакций является вегетативно-гуморальная система [17].

Таким образом, попытка поиска критериальных особенностей вегетативного обеспечения вегетативных функций, в том числе на фоне изменений циркадных ритмов, остается актуальным и перспективным вопросом для изучения с точки зрения профилактики развития дизрегуляторной патологии.

Известно, что целостный организм не является простой суммой физиологических систем и органов. С позиций нормальной, патологической физиологии и кибернетики он является многоконтурной многоуровневой самоуправляемой системой, описанной Р.М. Баевским [1, 3, 5]. Основными составляющими данной схемы являются центральный и периферический (автономный) контуры регуляции. При этом наиболее важным в рамках нормальной стабильной регуляции является автономный контур, в частности его парасимпатическое звено, которое осуществляет более тонкую, энергетически менее затратную и быструю настройку вегетативных функций за счет передачи медиатора ацетилхолина к рецепторам-мишеням по синаптическим связям.

Однако парасимпатическое звено вегетативной нервной системы, является и самым ранимым. При неблагоприятных условиях происходит перестройка модели регуляции, при которой основную нагрузку берет на себя центральный (симпато-гуморальный) контур регуляции [3]. Он является более глобальным и энергозатратным для организма. Например, при формировании системных стрессовых реакций, являясь при этом менее надежным и быстрым, так как регуляция осуществляется посредством медиатора адреналина, который реализует свои эффекты через сис-

темный кровоток. Следует подчеркнуть, что в этом случае, с точки зрения конечного результата — сохранения гомеостаза, регуляция вегетативных функций будет по-прежнему сохранена, но не способна обеспечивать необходимой надежности в долгосрочной перспективе.

Как отмечалось, основным регуляторным механизмом живого организма является вегетативно-гуморальная система. А одним из основных факторов, влияющих на регуляцию, является уровень внешней освещенности, на фоне периодического изменения которого через супрахиазматическое ядро гипоталамуса меняется активность работы шишковидной железы — эпифиза, регулирующего содержание мелатонина в крови и тканях организма, которое, в свою очередь, посредством биологических обратных связей, обеспечивает детальную синхронизацию вегетативных, поведенческих, социальных функций организма.

Мелатонин является гормоном, регулирующим (помимо прочего) цикличность, циркадность функций организма. При этом он не осуществляет непосредственной модуляции функции вегетативных систем, интенсивности или направленности их работы. В том числе показано отсутствие связи между уровнями мелатонина и вариабельностью ритма сердца как при нормальном цикле сон/бодрствование, так и при работе с ночными сменами [23, 26, 36].

Таким образом, поиск возможного влияния работы с ночными сменами на состояние здоровья человека следовало бы проводить не только на уровне регуляции внутреннего циркадного ритма (на фоне ациклически меняющегося уровня мелатонина крови), но и на межсистемном уровне регуляции вегетативных функций. Степень адаптации к работе в ночное время зависит от многих факторов (от конституциональных особенностей человека до его социального статуса), однако механизмы такой адаптации неспецифические и являются достаточно унифицированными для любого человека. Связано это прежде всего, как отмечалось, с перестройкой модели регуляции вегетативных функций, изменением «типа вегетативной нервной системы».

В условиях напряженной работы, к которой в полной мере можно отнести работу с ночными сменами, наиболее чувствительными и подверженными патологическим факторам являются механизмы регуляции сердечно-сосудистой системы. Система кровообращения рассматривается как индикатор адаптационных реакций всего организма, отражающий изменения вегетативного паттерна в ответ на высокие нагрузки. [3, 34]. Показано изменение вегетативного паттерна регуляции сердечно-сосудистой системы и повышенный риск развития заболеваний сердца при работе с ночными сменами [27, 30].

Одним из распространенных методов оценки функционального состояния сердечно-сосудистой системы является анализ variability ритма сердца (BPC). Это признанная методика исследования процессов регуляции физиологических функций, где система кровообращения рассматривается как индикатор адаптационных реакций всего организма, отражающий изменения вегетативного паттерна в ответ на высокие нагрузки [3]. Кроме того, данный метод предложено использовать для диагностики ранних признаков заболеваний сердечно-сосудистой системы [3, 38]. К настоящему времени накоплен огромный опыт применения этого метода для исследования вегетативной регуляции функций в условиях космического полета и показана его существенная роль в оценке функционального состояния организма космонавтов [21, 35], а также у профессиональных спортсменов [4, 32].

Анализ BPC в течение 24-часового периода (мониторирование) выявляет четкий циркадный ритм с заметным ночным снижением мощности низкочастотного (LF) компонента BPC, соответствующим снижению симпатической активности. Эти изменения отражали одновременное повышение высокочастотного компонента (HF), как выражение повышения вагусной активности, сопровождающей наибольшую часть сна.

При этом ряд работ указывают на то, что в результате анализа BPC на фоне выполнения рабочих обязанностей в ночные смены (депривация сна), происходят существенные изменения показателей кардиореспираторной системы в сторону сдвига в парасимпатикотонию и смещение показателя вегетативного баланса LF/HF [7, 11].

В других работах описывается ситуация, при которой работники с постоянными ночными сменами и чередующимися ночными сменами имели сниженную модуляцию высокочастотного компонента как во время бодрствования, так и во время дневного сна. При этом степень недостаточности парасимпатического компонента была выше в группе лиц с постоянными ночными сменами [24, 28].

Кроме того, в ходе исследования BPC во время работы в ночную смену регистрируется нормальная циркадная закономерность в виде превалирования высокочастотного компонента в регуляции работы сердечно-сосудистой системы. Такие данные, учитывая необходимость мобилизации всех функций высшей нервной деятельности во время выполнения рабочих обязанностей, могут рассматриваться как неблагоприятный фактор с точки зрения персистенции сонливости, снижения концентрации внимания, что непосредственным образом отражается на обеспечении безопасности производственного процесса [25].

В исследовании, в котором анализируются параметры BPC у женщин медицинского персонала работающих с

ночными сменами без права сна, выявлено достоверное снижение средних значений показателей BPC (VLF, LF, HF) в фоновой и активной ортостатической пробе, в сравнении с женщинами, работающими только в дневную смену. Это указывает на более низкие адаптационные возможности женщин, работающих в ночные смены в сравнении с женщинами, работающими днем [7].

Таким образом, подчеркивается, что цикличность основных показателей вегетативной нервной системы при работе даже с ночными сменами сохраняется, хотя и имеет ряд особенностей. Однако недостаточно уделено внимания изменению глобального вегетативного паттерна при работе с ночными сменами в долгосрочной перспективе, который, вероятно, имеет тенденцию к формированию симпатикотонии. Несмотря на значительное количество работ, посвященных анализу variability ритма при заболеваниях сердечно-сосудистой системы и в экстремальных условиях (длительного пребывания в состоянии невесомости, спорта высоких достижений), нет данных, которые бы отражали характер изменения механизмов регуляции вегетативных функций в условиях измененных циркадных ритмов (измененного ритма жизни на фоне работы с ночными сменами).

Особый интерес и практическую важность приобретает изучение механизмов десинхроноза у лиц, имеющих «скользящий», а не постоянный график ночных смен, особенности вегетативной иннервации которых, вероятно, имеют тенденцию к дизрегуляторной патологии. К одной из таких групп относятся работники локомотивных бригад, социальная значимость профессии которых, очень велика. Выполнение рабочих обязанностей машинистами локомотивов сопряжено с высокой ответственностью за жизни людей и сохранность грузов, точностью и скоростью действий при управлении локомотивом во время скоростного движения, необходимостью быстрого переключения внимания. При этом работа машинистов подразумевает непрерывность производственной деятельности, которая должна реализовываться вне зависимости от времени суток. Машинисты локомотивных бригад, чья работа подразумевает регулярные ночные смены, чередующиеся с работой в дневное время («скользящий» график работы), неизбежно подвергаются влиянию десинхронизации вегетативных функций [18].

Актуальность исследования регуляторных механизмов поддержания гомеостаза у данной категории работников обусловлена в первую очередь требованиями обеспечения безопасности труда, как для самого сотрудника, так и для окружающих. Машинист, обладающий несовершенными психофизиологическими качествами, при управлении поездом в условиях быстро движущегося объекта, динамизма транспортных ситуаций, повышенной готовности к экстренным действиям в условиях монотонии, повышенных требований к операторскому

мышлению, высокой персональной ответственности становится менее способным адекватно реагировать на ситуацию и принимать оптимальные решения [14, 20]. Во многих случаях адаптации к таким нервно-психическим нагрузкам выявляются вегетативные реакции подобные тем, что связаны с выполнением физической работы: повышенная ЧСС и увеличенный минутный объем дыхания, повышенное потоотделение, усиленный кровоток в коже с уменьшением электрического сопротивления, эмоциональные реакции в виде беспокойства, страха, депрессии [37]. Таким образом, в механизмах адаптации к подобной работе находит отражение превалирование активности симпатической нервной системы.

Такие особенности работы машинистов локомотивов всегда ставили и ставят необходимость тщательного и своевременного контроля за состоянием их здоровья [2, 33]. В этой связи, знание особенностей регуляции вегетативных функций и анализ функциональных резервов организма на фоне измененных циркадных ритмов, является актуальной проблемой в сфере «экстремального труда» — работы с посменным графиком, нередкой сменой часовых поясов.

Известно, что одним из последствий у лиц, работающих в условиях высокого напряжения, в особенности с наличием активных трудовых ночных смен, является нарушение функционирования надсегментарных вегетативных образований в виде эмоциональных сдвигов тревожно-депрессивного характера с патологической фиксацией эмоций, которые могут быть расценены как психовегетативный синдром [29]. Также установлено, что машинисты, страдающие артериальной гипертензией и нестабильным повышением АД, тахикардией, имеют худшие психофизиологические качества, обеспечивающие надежность выполнения рабочих обязанностей (сниженные стрессоустойчивость и готовность к экстремному действию в состоянии утомления) [13]. Вышеописанные изменения, которые могут возникать у машинистов в виде тревожно-депрессивных синдромов, нестабильное АД и тахикардия, являются на наш взгляд ничем иным как проявлением чрезмерного стабильного преобладания симпато-гуморального контура регуляции вегетативных функций.

У лиц страдающих заболеваниями сердечно-сосудистой системы или склонных к их возникновению риск осложнений, в том числе инфаркта миокарда и внезапной сердечной смерти, выше на фоне хронической десинхронизации циркадных ритмов (работы с ночными сменами) [18]. Такая ситуация может быть связана с постепенной перестройкой модели регуляции сердечно-сосудистой системы, при которой формируется неоптимальная, инертная схема на основе преобладания симпатического звена вегетативной нервной системы и центрального контура регуляции, увеличивающая риск фатальных осложнений в работе сердечно-сосудистой системы.

Таким образом, в основе регуляционных механизмов обеспечения вегетативных функций у работников локомотивных бригад, лежат нейропатофизиологические особенности структурно-функциональных изменений парасимпатического и симпатического звена вегетативной нервной системы, гуморального контура регуляции и принципы их регуляции на фоне инверсии циркадных ритмов, связанных с производственной необходимостью. Взаимосвязь вегетативной регуляторной функции в условиях измененных циркадных ритмов с общим функциональным состоянием головного мозга и психоэмоциональным статусом, оценка возможностей восстановления функциональных адаптационных резервов организма и пути их оптимизации, мониторинг, направленный на выявление ранних дизрегуляционных маркеров и предотвращение преждевременного развития нозологических состояний на настоящем этапе развития отраслевой хронобиологии являются, по мнению авторов, актуальной задачей железнодорожной медицины на стыке неврологии и профпатологии у работников ОАО «РЖД» с измененным циркадным ритмом жизни.

### Список литературы

1. **Анохин П.К.** Принципиальные вопросы общей теории функциональной системы // Принципы системной организации функций. — М.: Наука, 1973. — С. 5-61.
2. **Атьков О.Ю., Цфасман А.З.** 160 лет железнодорожной медицине России. К истории железнодорожной медицины // Железнодорожная медицина. — 2004. — №8. — С. 50-57.
3. **Баевский Р.М., Берсенева А.П., Берсенева Е.Ю., Ешманова А.К.** Использование принципов донологической диагностики для оценки функционального состояния организма при стрессорных воздействиях (на примере водителя автобуса) // Физиология человека. — 2009. — Т. 35, №1. — С. 41-51.
4. **Берсенева Е.Ю., Воронов А.В., Баевский Р.М.** Половые особенности variability сердечного ритма у юных спортсменов в разные периоды суток // Медико-биологические технологии повышения работоспособности в условиях напряженных физических нагрузок. Выпуск 2. Сборник статей. — 2006. — С. 137-148.
5. **Гусев Е.И., Крыжановский Г.Н.** Дизрегуляционная патология нервной системы. — М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2009. — С. 19-23, 148-152.
6. **Дуров А.М., Аминова Т.В.** Особенности циркадианной организации показателей variability ритма сердца у женщин зрелого возраста с ночным и дневным графиком работы // Вестник Тюменского государственного университета. — 2007 — №6. — С. 43-48.
7. **Еськов В.М., Кашина Ю.В., Мишина Е.А., Филатова М.А.** Состояние функциональных систем организма человека в условиях нарушения суточной ритмики // Вестник новых медицинских технологий. — 2007. — Т. XIV, №1. — С. 27-29.
8. **Заславская Р.М.** Хронотерапия как метод оптимизации терапии больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями // Железнодорожная медицина и профессиональная биоритмология. — 2012. — №20. — С. 27-35.
9. **Камаев И.А., Леонова Е.С., Щекотов Е.В.** Особенности заболеваемости машинистов локомотивов горьковской железной дороги // Медицинский альманах. — 2010. — №3(12). — С. 14-17.

10. **Комаров Ф.И., Рапопорт С.И., Чибисов С.М.** «Хронобиология и хрономедицина» — стратегическое направление в биологии и медицине. // Мат. Первого Российского съезда по хронобиологии и хрономедицине с международным участием, г. Владикавказ, 15-17 октября 2008 г. — Владикавказ: ИПО СОИГСИ. — С. 76.
11. **Королева М.А.** Оценка вегетативной регуляции сердечного ритма на фоне 24-часовой депривации сна и после интенсивного светового воздействия // Вестник ТГУ. — 2009. — Т. 14. — Вып. 1. — С. 48-51.
12. **Круглов В.Н.** Нарушения вегетативной регуляции и синдром артериальной гипертензии у работников локомотивных бригад с шейным миофасциальным болевым синдромом. — Казань, 2007.
13. **Пантелеева Н.А.** Оценка артериальной гипертензии у лиц водительской группы железнодорожного транспорта: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — М., 2005.
14. **Парин В.В.** Прогнозирование в космической биологии // Прогнозирование научно-технического прогресса. — М.: Знание, 1968. — С. 31-36.
15. **Сабитов И.А.** Социальные и профессионально-стрессовые факторы риска психосоматических расстройств у работников локомотивных бригад // Материалы Юбилейной научно-практической конференции, посвященной 125-летию Дорожной клинической больницы ст. Самара. — Самара, 2002. — С. 134-135.
16. **Савицкая Е.Ю., Куделькина Н.А., Малютина С.К.** Артериальная гипертензия, «рабочий стресс» и поражение органов-мишеней у железнодорожников, работающих в условиях повышенного профессионального риска // Бюллетень СО РАМН. — 2010. — Т. 30, №6. — С. 41-45.
17. **Смирнов В.М., Свешиников Д.С., Яковлев В.Н., Правдищев В.А.** Физиология центральной нервной системы. 5-е изд-е, испр. — М.: Издательский центр «Академия», 2007. — С. 286.
18. **Цфасман А.З.** Железнодорожная клиническая медицина. Профессинальные болезни. — М.: РАПС, 2000. — С. 8-12.
19. **Цфасман А.З., Апаев Д.В.** Циркадная ритмика артериального давления при измененном суточном ритме жизни. — М.: Репроцентр М, 2010. — С. 8-12, 73-77.
20. **Anderson C.J.** The psychology of doing nothing // Psychological Bulletin. — 2003. — 129. — P. 139-167.
21. **Baevsky R.M., Chernikova A.G.** Heart rate variability analysis in evaluation of functional state in humans during long-term space flight // Adv. Space Res. — 1998. — Vol. 2, №2. — 14 Man in Space Symposium, Banff, Alberta, Canada, May 2003.
22. **Bernardi L., Ricordi L., Lazzari P.** et al. Impaired circadian modulation of sympatho-vagal activity in diabetes // Circulation. — 1992. — 86. — P. 1443-1452.
23. **Burgess H.J., Sletten T., Savic N.** et al. Effects of bright light and melatonin on sleep propensity, temperature, and cardiac activity at night // J. Appl. Physiol. — 2001. — Sep. — 91(3). — P. 1214-1222.
24. **Chung M.H., Kuo T.B., Hsu N.** et al. Comparison of sleep-related cardiac autonomic function between rotating-shift and permanent night-shift workers // Ind. Health. — 2011. — 49(5). — P. 589-596. Epub. 2011 Aug 1.
25. **Furlan R., Barbic F., Piazza S.** et al. Modifications of cardiac autonomic profile associated with a shift schedule of work // Circulation. — 2000. — Oct. 17. — 102(16). — P. 1912-1916.
26. **Harris A.S., Burgess H.J., Dawson D.** The effects of day-time exogenous melatonin administration on cardiac autonomic activity // J. Pineal Res. — 2001. — Oct. — 31(3). — P. 199-205.
27. **Holmes A.L., Burgess H.J., McCulloch K.** et al. Day-time cardiac autonomic activity during one week of continuous night shift // J. Hum. Ergol. (Tokyo). — 2001. — Dec. — 30(1-2). — P. 223-228.
28. **Ishii N., Iwata T., Dakeishi M., Murata K.** Effects of shift work on autonomic and neuromotor functions in female nurses // J. Occup. Health. — 2004. — Sep. — 46(5). — P. 352-358.
29. **Makhovskaya T., Serduk N., Chernykh E., Khandurina G.** Rhythmographia for detection predictors of violations of a rhythm in railways workers // JRME NIIGATA, 2004 The Eleventh International Symposium of the Japan-Russia Medical Exchange 2004. — Nngata, 2004.
30. **Matveev M., Prokopova R.** Normal and abnormal circadian profiles of heart autonomic balance, evaluated by time-related common indicator of heart rate variability // Anadolu Kardiyol. Derg. — 2007. — Jul. — 7. — Suppl. 1. — P. 125-129.
31. **Merkulova D.M., Merkulov Y.A., Myasoedova V.A.** et al. Dexketoprofen trometamol in treatment of dorsalgia of various etiologies // European Journal of Neurology. — 2006. — Vol. 13 (2). — P. 253.
32. **Mourot L., Bouhaddi M., Perrey S.** et al. Decrease in heart rate variability with overtraining: assessment by the Poincaré plot analysis // Clin. Physiol. Funct. Imaging. — 2004. — Jan. — 24(1). — P. 10-18.
33. **Pankova V.B., Kaptsov V.A., Ermakova T.V., Kameneva E.A.** Priorities of health-promoting and medical rehabilitation in railwaymen // Gig. Sanit. — 2007. — Jan.-Feb. (1). — P. 34-36.
34. **Peter A. van Zwieten.** — European Society of Hypertension Scientific Newsletter, 2003. — P. 4-18.
35. **Shiraishi M., Kamo T., Kamegai M.** et al. Periodic structures and diurnal variation in blood pressure and heart rate in relation to microgravity on space station MIR // Biomed. Pharmacother. — 2004. — Oct. — 58. — Suppl. 1. — P. 31-34.
36. **Sletten T., Burgess H., Savic N.** et al. The effects of bright light and nighttime melatonin administration on cardiac activity // J. Hum. Ergol. (Tokyo). — 2001. — Dec. — 30(1-2). — P. 273-278.
37. **Takase B., Akima T., Satomura K.** et al. Effects of chronic sleep deprivation on autonomic activity by examining heart rate variability, plasma catecholamine, and intracellular magnesium levels // Biomed. Pharmacother. — 2004. — Vol. 58, №1. — P. 35-39.
38. **Togo F., Takahashi M.** Heart rate variability in occupational health a systematic review // Ind. Health. — 2009. — Dec. — 47(6). — P. 589-602.

Поступила 12.09.2012

### Сведения об авторах:

**Меркулов Юрий Александрович**, д-р мед. наук, главн. науч. сотр. лаб. нервно-мышечной патологии НИИ ОПП РАМН, врач-невролог НЦ им. Б.М. Гехта, ЦКБ №2 им. Н.А. Семашко ОАО «РЖД»

**Меркулова Дина Мироновна**, д-р мед. наук, зав. лаб. нервно-мышечной патологии человека НИИ ОПП РАМН, проф. каф. нервных болезней ФППОВ ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, рук. неврологического центра им. Б.М. Гехта, ЦКБ №2 им. Н.А. Семашко ОАО «РЖД»



А.Н. Макаренко<sup>1</sup>, С.Г. Морозов<sup>2</sup>, С.И. Савосько<sup>3</sup>, И.Г. Васильева<sup>4</sup>

## Метод моделирования повторного локального геморрагического инсульта у крыс

<sup>1</sup> Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, биологический факультет, Украина, 03022, Киев-022, просп. Академика Глушкова, 2

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

<sup>3</sup> Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Украина, 01024, Киев, ул. Богомольца, 4

<sup>4</sup> Государственное учреждение Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова Украинской академии медицинских наук, Киев, 04050, ул. Платона Майбороды (Мануильского), 32

*Разработан стандартизированный метод воспроизведения в эксперименте повторного инсульта у крыс. Особенность данного варианта воспроизведения повторного инсульта состоит в моделировании аутогеморрагического правополушарного инсульта путем механического повреждения ткани после 10-суточной окклюзии правой общей сонной артерии. Модель удобна для воспроизведения повторного стандартизированного локального поражения головного мозга, является более адекватной формой моделирования острой и хронической цереброваскулярной патологии, чем использование только локального кровоизлияния введение аутокрови в структуры мозга интактных животных. По морфологическим характеристикам модель приближается к клиническим вариантам развития и течения острого геморрагического инсульта после предыдущей хронической мозговой недостаточности по ишемическому типу.*

**Ключевые слова:** повторный локальный геморрагический инсульт, метод/моделирование, морфологические особенности, головной мозг крыс

A.N. Makarenko<sup>1</sup>, S.G. Morozov<sup>2</sup>, S.I. Savosko<sup>1</sup>, I.G. Vasil'eva<sup>3</sup>

## Simulation of repeated local hemorrhagic stroke in rats

<sup>1</sup> Taras Shevchenko Kyiv national university, 2, prosp. Akademika Glushkova, Kyiv-022, 03022, Ukraine

<sup>2</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

<sup>3</sup> Bogomoletz Institute of Physiology, 4, Bogomoletz str., Kyiv, 01024, Ukraine

<sup>4</sup> Institute of Neurosurgery named after A.P. Romodanov, Ukrainian Academy of Medical Science, 326 Platon Mayboroda str., Kiev, 04050, Ukraine

*The processes of developed in CNS the complicated stroke and developments of fittings for their pharmaceutical therapy were developed and offering by standardized method of the experimental secondary stroke in rats, suitable for the use in sharp and chronic researches. Variant of repeated hemorrhagic stroke consist of autohemorrhagic right hemisphere stroke by the mechanical damage of brain tissue after 10-daily occlusion of right common carotid artery was studied. A model is comfortable for reproducing of the repeated standardized local damage of brain, is more adequate form of design of transient and chronic cerebrovascular pathology, than the independent use of local hemorrhage of autoblood in the brain of animals. The morphological description of model approaches the clinical variants of development and flow of sharp hemorrhagic stroke after a previous chronic cerebral insufficiency on an ischemic type.*

**Key words:** repeated local hemorrhagic stroke, method/modeling, morphological features, rat brain

**Для переписки:** Морозов Сергей Георгиевич, д-р биол. наук, чл.-корр. РАМН, зам. дир. по научной работе ФГБУ НИИОПП РАМН. E-mail: bior-harm@list.ru

Лечение нарушений мозгового кровообращения представляет собой одну из самых актуальных проблем современной медицины. Ежегодно в мире острые нарушения мозгового кровообращения регистрируют-

ся более чем у 6 млн чел., у 700—750 тыс. — в США, свыше 450 тыс. — в России и около 175 тыс. — в Украине [1]. В настоящее время является общепринятым, что локальный острый экспериментальный инсульт, воспроизведенный в ЦНС животных, является адекватной моделью для исследования процессов цереброваскулярной патологии, особенностей их коррекции и разработки новых лекарственных препаратов для лечения инсульта.

Ранее нами был разработан метод локального кровоизлияния (острого аутогеморрагического инсульта)

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

[6], который в настоящее время широко используется различными специалистами — фармакологами, патофизиологами, специалистами по ВНД и др. [2, 8, 11]. В данной работе предлагается новая модель воспроизведения повторного церебрального инсульта. Основным требованием при ее разработке являлось соответствие или максимальное приближение к условиям и особенностям течения данной патологии у больных, которая развивается на фоне хронических предшествующих цереброваскулярных заболеваний [4]. После транзиторных ишемических атак (ТИА) у 27—73% пациентов в течение 7 сут. развивается ишемический инсульт [16]. Главными факторами ТИА и ишемического инсульта являются стеноз экстракраниальных сосудов (80%). При этом несвоевременное (отсроченное) проведение тромболитической терапии в 29% случаев сопровождается геморрагической трансформацией ишемизированных участков мозга [13].

В настоящее время разработаны различные методы моделирования острого геморрагического инсульта [17]. Кровоизлияние, вызванное, в частности, постепенным введением (в течение 3—4 мин) в область внутренней капсулы аутокрови (2 мл), сопровождается формированием у животных не стандартизированной и очерченной гематомы различных размеров. Процесс моделирования сопровождается быстрым повреждением обширных участков мозга, разрушением подкорковых клеточных структур и, реже, проводящих путей белого вещества коры больших полушарий. Причем эта и подобные ей экспериментальные модели характеризуются высоким процентом летальности животных, что делает указанные модели мало пригодными для использования в хронических экспериментах. Кроме того методы моделирования острого геморрагического инсульта разработаны для использования преимущественно на крупных животных (свиньи), в то время как современные скрининговые исследования предполагают широкое использование главным образом мелких лабораторных животных (крысы, мыши и др.) [5, 7].

Используемые методы моделирования инсульта имеют и другие существенные недостатки. В частности после забора аутокрови ее смешивают с гепарином (в соотношении 10:1) и вводят интрацеребрально под давлением 120—150 мм рт.ст. в область внутренней капсулы одного из полушарий головного мозга, в связи с тем, что данная локализация гематомы наиболее часто встречается в клинической неврологической практике [12]. Нарастающая внутримозговая компрессия усугубляется не только повреждением церебральных сосудов, но и проявлениями интрацеребрального отека, сопровождается проникновением и/или прорывом крови в цереброспинальную систему мозга животных. Одновременно отмечается ее ретроградное проникно-

вание по треку канюли, в результате чего кровь часто обнаруживается в мозговых желудочках и под мозговыми оболочками. В результате развития осложнений, которые особенно часто регистрируются при воспроизведении биполушарного инсульта, летальность экспериментальных животных возрастает с 27% до 80%. И, наконец, следует признать, что главным недостатком используемых в настоящее время моделей геморрагического инсульта является внезапное развитие у интактных животных внутримозгового кровоизлияния. Это противоречит данным специальной литературы, в которой неоднократно подчеркивается, что геморрагический инсульт наступает вследствие постепенного развития патологии церебральных сосудов, либо геморрагической трансформации ишемического инсульта (по типу смешанного инсульта) [4].

*Цель работы* — создание модели двухэтапного локального повторного инсульта, близкого по патогенезу, объему и степени поражения участка мозга острому нарушению мозгового кровообращения у человека.

### Методика

Работа выполнена на 120 крысах-самках (средняя масса  $203,1 \pm 7,5$  г) которые были разделены на 5 групп: контрольные животные (интактные,  $n=10$ ), ложнооперированные животные ( $n=10$ ), животные у которых осуществляли хроническую окклюзию правой общей сонной артерии (a. carotis communis dextra) ( $n=20$ ), животные с геморрагическим инсультом ( $n=40$ ) и группа животных с повторным инсультом ( $n=40$ ). Ложнооперированным животным делали отверстие в черепе крыс соизмеримое диаметру канюли ( $L=3,5—4,0$ ;  $H=6,0$ ;  $AP=0,6—1,0$ ) без введения канюли в ткань мозга. Животным с фокальным ишемическим инсультом выполняли хроническую окклюзию правой общей сонной артерии. Для этого животных наркотизировали интраперитонеальным введением тиопентала натрия (60 мг/кг). Крысы в положении «лежа на спине» в нижней области шеи делали надрез длиной 1,5—2 см (рис. 1). Отделив подкожную ткань и мышцы, получали доступ к правой общей сонной артерии. Лигирование и окклюзию общей сонной артерии проводили на уровне 18—20 мм до ее бифуркации на наружную и внутреннюю ветви с помощью шелковой нити 6/0 (Ethicon Ltd., Edinburgh, UK). После этих процедур рану наглухо зашивали нитью 10/0 («Ethicon» Шотландия) и обрабатывали йодом, а опытных животных возвращали в клетки и наблюдали в течение всего периода окклюзии, т.е. в течение 10 сут. Через 10 сут. животным под тиопенталовым наркозом делали транскардиальную перфузию 4%-ным раствором параформальдегида в 0,1 н фосфатном буфере (рН 7,4) и извлекали мозг для гистологического исследования.

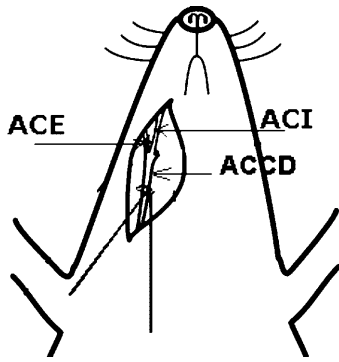


Рис. 1. Первый этап моделирования повторного локального инсульта (окклюзия правой общей сонной артерии): ACCD — a. carotis communis dextra; ACE — a. carotis externa; ACI — a. carotis interna.

Для моделирования геморрагического инсульта (церебральной геморрагии) опытным животным интраперитонеально вводили тиопентал натрия в дозе 60 мг/кг. Воспроизведение ограниченного кровоизлияния (рис. 2 А, Б) у наркотизированных крыс достигали механическим разрушением ткани внутренней капсулы (capsula interna,  $L=3,5-4,0$ ;  $H=6,0$ ;  $AP=0,6-1,0$ ) [13]. В область внутренней капсулы с помощью стереотакса вводится мандрен-нож с целью локального разрушения ткани мозга и соответствующих кровеносных сосудов (рис. 2А). Моделирование достигается 4—6 вращательными движениями изогнутого мандрена-ножа с последующим введением в область внутренней капсулы (через 3—4 мин после разрушения) 0,15—0,2 мл аутокрови животного (рис. 2Б). Кровь вводили постепенно в течение 20—30 с, учитывая маленький объём [6]. Мандрен-нож погружается в ткань мозга (область внутренней капсулы) в направляющей инъекционной игле-канюле в результате использования стереотаксического способа ее введения. Наружный диаметр иглы составляет 0,4 мм, при этом скос иглы-канюли предварительно стачивается, а кромка полученного цилиндра остро затачивается. При моделировании инсульта это существенно ускоряет и оптимизирует процесс введения направляющей мандрен-иглы в соответствующие образования мозга. Верхняя часть мандрена-ножа вместе с иглой-канюлей прочно закрепляется в отверстии держателя стереотаксического прибора (СТМ-3, Россия). После введения направляющей полой иглы-канюли в заданную структуру мозга (в данном случае — во внутреннюю капсулу) согласно стереотаксическому атласу мозга крысы [14] из нее выдвигается на 1 мм отклоненный и заточенный мандрен-нож. После 4—6 поворотов по часовой стрелке и против неё мандрен-нож и направляющую иглу-канюлю извлекают манипулятором из мозга животного. После 10 дней с момента моделирования геморрагии животным под тиопенталовым наркозом (60 мг/кг) выполняли транскардиальную перфу-

зию 4%-ным раствором параформальдегида в 0,1 н фосфатном буфере (рН 7,4).

Для воспроизведения у крыс повторного хронического нарушения мозгового кровообращения была разработана модель повторного двухэтапного инсульта. Для достижения желаемого результата животным под наркозом моделировали хроническую окклюзию правой общей сонной артерии, а через 10 сут. повторно наркотизировали для моделирования интрацеребральной гематомы согласно вышеописанной методики. После проведенного оперативного вмешательства и последовательных манипуляций рану наглухо зашивали нитью 10/0 («Ethicon» Шотландия) и обрабатывали 5%-ным спиртовым раствором йода. Через 10 сут. после воспроизведения геморрагии, т.е. через 20 сут. с момента хронической окклюзии, животных вновь наркотизировали для выполнения транскардиальной перфузии 4%-ным раствором параформальдегида в 0,1 н фосфатном буфере (рН 7,4). Головной мозг крыс всех опытных групп использовали для изготовления фронтальных срезов для гистологического исследования. После стандартной проводки материал заливали в парафин, а срезы толщиной 10 мкм окрашивали гематоксилин-эозином [15].

### Результаты и обсуждение

При гистологическом исследовании головного мозга крыс через 10 сут. после хронической окклюзии в правом полушарии головного мозга были выявлены фокальные участки с признаками некроза и отека нервной ткани. Выраженный отек с размозжением ткани (площадь зоны инфаркта в плоскости среза мозга в среднем  $0,46 \pm 0,1$  мм<sup>2</sup>) определялся в области мозолистого тела и сенсомоторного неокортекса на уровне  $L=1,0-2,5$ ,  $H=2,0-3,0$ ,  $AP=0,0-1,0$ . В правой гемисфере в участках вышеуказанной локализации отмечены признаки ангионекроза цереброкортикальных артериол средней мозговой артерии с явлениями фокального диапедеза эритроцитов (рис. 3). Таким образом, в условиях хро-

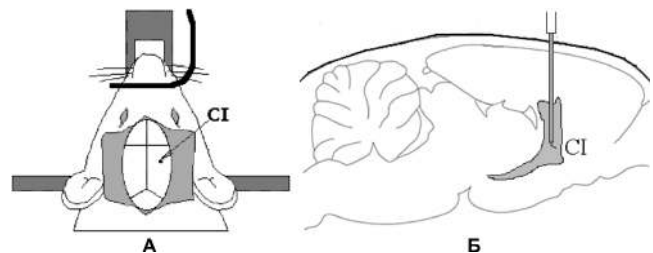


Рис. 2. Второй этап моделирования повторного локального инсульта: А — высверлено трепанационное отверстие в черепе для введения канюли с мандреном-ножом в область внутренней капсулы (CI); Б — введение канюли с мандреном-ножом в область внутренней капсулы и разрушение ткани и соответствующих сосудов внутренней капсулы, с целью формирования внутримозговой посттравматической гематомы.

нической окклюзии общей сонной артерии в ткани большого мозга [3], обнаруживаются церебральные гемодинамические нарушения, которые завершаются развитием фокального некроза ткани мозга.

При изучении головного мозга опытных крыс с геморрагическим инсультом (интрацеребральной геморрагией) во внутренней капсуле обнаруживается деструкция мозговой ткани, а также кровоизлияние в эту область. На фронтальных срезах мозга гематома локализуется в области внутренней капсулы ипсилатерального полушария (площадь гематомы в плоскости среза мозга в среднем  $8,63 \pm 0,13 \text{ мм}^2$ ). При этом кора головного мозга повреждается несущественно (рис. 4А).

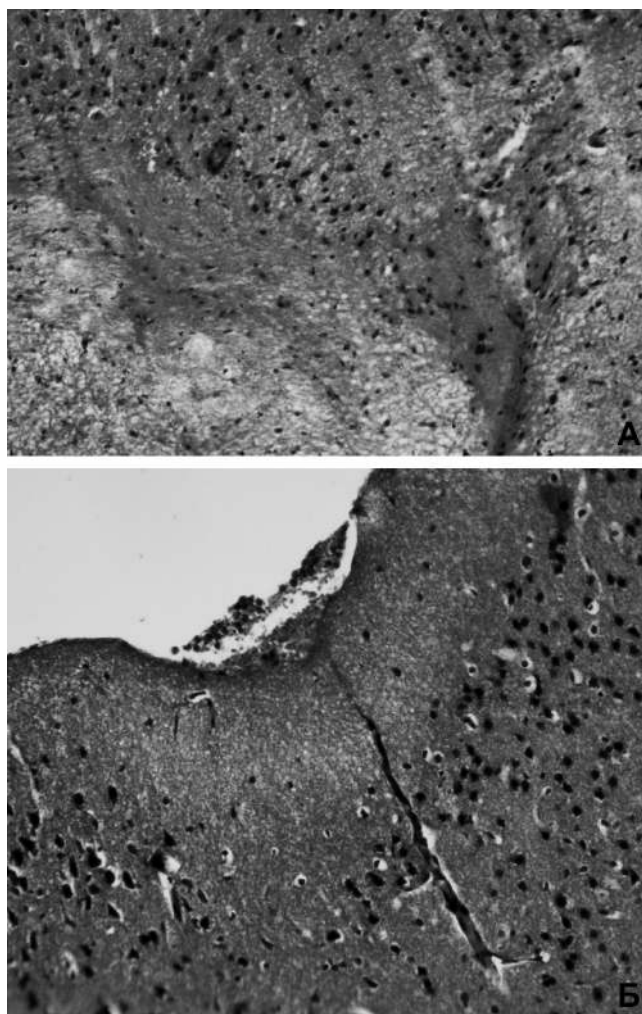


Рис. 3. Патологические изменения цереброкортикальных кровеносных сосудов и ткани мозга вследствие хронической окклюзии правой общей сонной артерии:

А — диапедез эритроцитов на границе неокортекса и мозолистого тела, отек ткани мозолистого тела; Б — фокальные некробиотические изменения в «—» слоях цереброкортекса.

Окраска: гематоксилин-эозин. Об.20, ок.10.

Метод моделирования апробирован на 40 половозрелых нелинейных крысах самцах. Забой животных проводили через 10 сут. после завершения моделирования геморрагического инсульта, или через 20 сут. после окклюзии правой общей сонной артерии. Гематомы в области правой внутренней капсулы у экспериментальных животных были однотипны (площадь гематомы в плоскости среза мозга в среднем  $7,93 \pm 0,37 \text{ мм}^2$ ), при этом проникновения крови в желудочки мозга или в субарахноидальное пространство нами не обнаружено. Вокруг гематомы отмечены процессы активной пролиферации глиальных клеток, а в лобной доле обоих полушарий (сенсомоторного неокортекса) — гибель пирамидных нейронов (рис. 4).

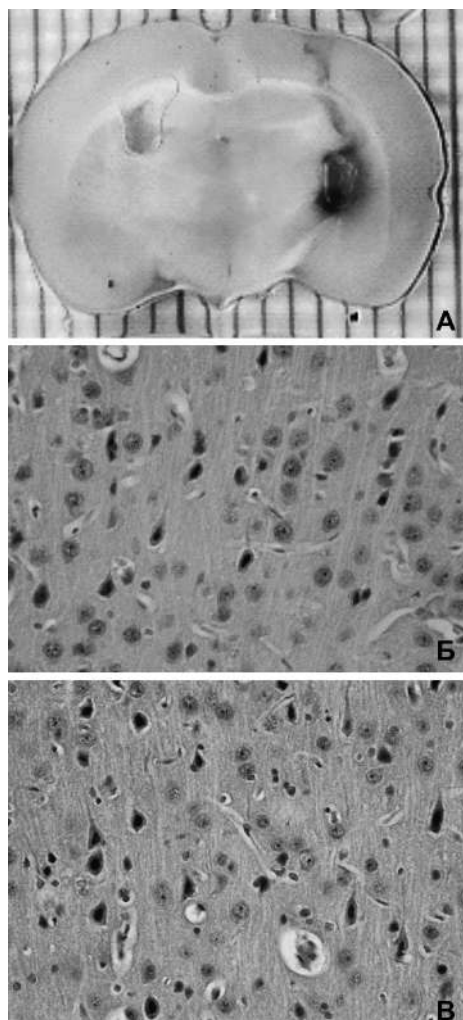


Рис. 4. Изменение в коре головного мозга животных при инсульте: А — интрацеребральная гематома (неокрашенный фронтальный срез головного мозга крысы); Б — геморрагический инсульт (интрацеребральная гематома); В — повторный инсульт (интрацеребральная гематома на фоне 10-дневной хронической окклюзии *a. carotis communis dextra*).

Окраска: гематоксилин-эозин. Об.40, ок.10.

Таким образом, модель повторного локального правополушарного геморрагического инсульта практична, максимально стандартизирована, может быть использована для воспроизведения очагов кровоизлияний и в других клеточных образованиях головного мозга. Предложенная модель максимально приближена к патогенезу острого геморрагического инсульта (геморрагии) на фоне хронической недостаточности мозгового кровообращения (ХНМК) по ишемическому типу. Новизной и отличительной особенностью модели является воспроизведение геморрагии в пределах ранее задействованного ишемическим повреждением полушария мозга.

В работах других исследователей [12] было показано, что гемодинамические нарушения в области бифуркации общей сонной артерии вызывают неврологические нарушения, в основе которых лежит развитие фокального инфаркта в цереброкортексе. В нашем исследовании было установлено развитие структурных нарушений в сенсомоторном цереброкортексе и мозолистом теле ипсилатерального полушария головного мозга крыс. Модели геморрагического инсульта уже используются в фармакологической практике для изучения особенностей действия лекарственных средств [10], но их главным недостатком является то, что гематома формируется в интактном мозге, в то время как в клинической практике на фоне артериальной гипертензии, пропитывания ранее сформированного ишемического очага или вследствие несвоевременной тромболитической терапии [13]. В данном случае наша модель позволяет избежать такого несоответствия, так как повторная ХНМК развивается на фоне уже сформированного фокального ишемического очага.

Разработанная модель может быть применена для изучения фармакологических препаратов с нейропротекторным действием.

### Список литературы

1. **Бабин В.Г., Атаманчук И.Н., Давиденко Г.М.** Множественные аномально расположенные хорды на верхушке левого желудочка — этиологический и патогенетический факторы ишемического инсульта у лиц молодого возраста // Лікарська справа. — 2004. — №5-6. — С. 62-64.
2. **Воронина Т.А., Кузнецова Е.А., Гарибова Т.Л., Крайнева В.А., Макаренко А.Н., Мирзоян Г.Р., Галаева И.П., Капица И.Г., Кириченко С.В.** Эффект нооглютина у крыс с интрацеребральной посттравматической гематомой (геморрагическим инсультом) // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2003. — Т. 66, №3. — С. 13-16.
3. **Ганнушкина И.В., Шафранова В.П., Рясина Т.В.** Функциональная ангиоархитектоника головного мозга. — М.: Медицина, 1977. — 240 с.
4. Геморрагический инсульт / Под ред. В.И. Скворцовой, В.В. Крыловой. — М.: Геотар-медиа, 2005. — 154 с.
5. **Легнер Э.Н., Бибелейшвили Ш.И.** Электрическая активность головного мозга при экспериментальной модели

геморрагического инсульта // Электрофизиология нервной системы. — Ростов-на-Дону: Изд-во РГУ, 1963. — 226 с.

6. **Макаренко А.Н., Косицын Н.С., Пасикова Н.В., Свинов М.М.** Метод моделирования локального кровоизлияния в различных структурах головного мозга для экспериментальных целей // Журнал высшей нервной деятельности. — 2002. — Т. 52, №6. — С. 765-768.

7. **Мирзоян Р.С., Саратиков А.С., Плотников М.Б., Топчан А.В., Ганьшина Т.С.** Методологические указания по экспериментальному изучению препаратов для лечения нарушений мозгового кровообращения и мигрени // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М.: Наука, 2000. — С. 159-161.

8. **Середенин С.Б., Крайнева В.А.** Нейропротекторные свойства афобазола при повторном моделировании геморрагического инсульта у старых крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2010. — №2. — С. 165-168.

9. **Суслина З.А., Пирадов М.А.** Инсульт: диагностика, лечение, профилактика. — МЕДпресс, 2009. — 288 с.

10. **Федоренко А.В., Крайнева В.А., Вальдман Е.А.** Влияние афобазола и мексидола на ориентационно-исследовательское поведение при моделировании интрацеребральной посттравматической гематомы / Материалы 5-й Междунар. Конф. «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психическим средствам» (1-4.06.2010, Москва, РФ) // Эксп. и клин. фармакол. — 2010. — Приложение. — С. 89.

11. **Шестаков В.А., Шестакова Е.В.** Противоишемное действие Актоинвита (субстанции S-1) при экспериментальном геморрагическом инсульте // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2009. — №4. — С. 2-5.

12. **Alexis N.E., Dietrich W.D., Green E.J., Prado R., Watson B.D.** Nonocclusive common carotid artery thrombosis in the rat results in reversible sensorimotor and cognitive behavioral deficits // Stroke. — 1995. — Vol. 26(12). — P. 2338-2346.

13. **Lansberg M.G., Thijs V.N., Bammer R., Kemp S., Wijman C.A.C., Marks M.P., Albers G.W.** Risk factors of symptomatic intracerebral hemorrhage after tPA therapy for acute stroke // Stroke. — 2007. — Vol. 38, №8. — P. 2275-2278.

14. **Paxinos G., Watson C.** The rat brain in stereotaxic coordinates. — Sydney: Academic Press, 1982. — 1480 p.

15. **Relton J.K., Beckey V.E., Hanson W.L., Whalley E.T.** CP-0597, a Selective Bradykinin B<sub>2</sub> Receptor Antagonist, Inhibits Brain Injury in a Rat Model of Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion // Stroke. — 1997. — Vol. 28. — P. 1430-1436.

16. **Rothwell P.M., Giles M.F., Flossmann E., Lovelock C.E., Redgrave J.N., Warlow C.P., Mehta Z.** A simple score (ABCD) to identify individuals at high early risk of stroke after transient ischaemic attack // Lancet. — 2005. — Vol. 366(9479). — P. 29-36.

17. **Wagner K.R., Xi G., Hua Y., Kleinholz M., de Courten-Myers G.M., Myers R.E., Broderick J.P., Brott T.G.** Lobar intracerebral hemorrhage model in pigs: rapid edema development in perihematomal white matter // Stroke. — 1996. — Vol. 27, №3. — P. 490-497.

Поступила 12.05.12

© Х.М. Марков, 2013  
УДК 616.8-092

Х.М. Марков

## Мозговой кровоток и церебральный инсульт. Часть 1. Регуляция церебрального кровообращения

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр здоровья детей» Российской академии медицинских наук, 119991, Москва, Ломоносовский просп., 2, стр.1

Представлены данные, касающиеся анатомии мозговых сосудов и основных параметров церебрального кровотока. Рассмотрены механизмы регуляции кровообращения в головном мозге, в том числе сосудорасширяющие (оксид азота, простаглицлин, эндотелиальный гиперполяризирующий фактор, эстроген, кальцитонин) и сосудосуживающие (тромбоксан А<sub>2</sub>, эндотелин), а также взаимодействие между ними и другими вазотропными агентами. Подчеркнута ведущая роль сосудистого эндотелия и системы оксида азота в регуляции церебрального кровообращения. Проанализированы механизмы нейрососудистого сопряжения, ауторегуляция мозгового кровотока, влияния различного рода функциональных нагрузок (гипероксия и гипоксия, гиперкапния и гипокания, ацидоз) на кровообращение в головном мозге, различия между ними в центральной и периферической циркуляциях крови, оксидантного стресса, воспаления. Показано значение этих данных для механизмов патогенеза и терапии церебрального инсульта, других физиологических и патофизиологических процессов в головном мозге.

**Ключевые слова:** мозговой кровоток, церебральный инсульт, ауторегуляция мозгового кровотока, вазотропные агенты

Kh.M. Markov

## Brain blood flow and cerebral insult. Part 2. Regulation of cerebral circulation

The data, concerning anatomy of brain vessels and the main parameters of cerebral blood flow, including vascular dilation (nitric oxide, prostacyclin, endothelial hyperpolarising factor, estrogen, calcitonin) and vascular contracting (thromboxan A<sub>2</sub>, endothelin) agents, as well the interaction between them have been scrutinized. Emphasized the leading role of vascular endothelium and nitric oxide in the regulation of cerebral circulation. Analysis have been done of mechanisms of neuron/vascular conjugent, autoregulation of the brain blood flow, effects of functional loading (hyperoxia, hypoxia, hypercapnia, hypocapnia, acidosis) on the cerebral circulation, the different reactions between them in central and peripheral circulations, oxidant stress, inflammation. Pointed the significance of these data for the pathogenic mechanisms and therapy of cerebral insult, others physiological and pathophysiological process in the brain.

**Key words:** brain blood flow, cerebral insult, blood flow autoregulation, vasotropic agent

### 1. Анатомия сосудов мозга и основные параметры церебрального кровотока

Четыре главные артерии и их разветвления снабжают мозг кровью: две внутренние каротидные, происходящие из общих каротидных артерий и две вертебральные (позвоночные), являющиеся ветвями подключичной артерии. Обе позвоночные артерии соединяются между собой, образуя базилярную артерию, которая соединяется с каротидными и вместе с ними формируют круг Виллиса (circus arteriosus) на нижней поверхности мозга.

Круг Виллиса состоит из правой и левой внутренних каротидных артерий, соединенных с передней связующей артерией. Базилярная артерия разветвля-

ется на правую и левую церебральные артерии, которые анастомозируют с левой и правой каротидными артериями через левую или правую заднюю связующую артерию. Многие артерии происходят из круга Виллиса, включая передние церебральные артерии. Разветвления круга Виллиса переходят в резистивные артериолы, сосуды мягкой мозговой оболочки, которые проникают в паренхиму мозга под прямым углом, как проникающие или паренхимальные артериолы.

С помощью радиоизотопных исследований было показано, что большая часть крови, поступающей в мозг через левую внутреннюю каротидную артерию и левую позвоночную артерию снабжают кровью левое полушарие мозга, а правая внутренняя каротидная и правая позвоночная артерии — правое полушарие. Через каждую артерию кровь поступает в специфиче-

Для корреспонденции: Марков Христо Матеевич, проф., д-р мед. наук, ФГБУ «НЦЗД» РАМН. E-mail: info@nczd.ru

скую область мозга, но, как правило, туда же поступает и определенное количество крови из соседних артерий; происходит дублирование их функций, что имеет большое компенсаторное значение. Такое же, еще более существенное значение имеет круг Виллиса, так как в случае закупорки или сжатия какой-нибудь из формирующих его артерий, кровь в соответствующую область мозга поступает из циркулирующей в круге Виллиса крови из других артерий.

Вены церебральной циркуляции, осуществляющие возврат деоксигенированной крови из мозга, лишены клапанов и имеют очень тонкие стенки. Они проходят через субарахноидальное пространство, арахноидальную ткань, твердую мозговую оболочку и, объединяясь, выносят деоксигенированную кровь в венозный синус черепа. Церебральные вены бывают внутренними и наружными. При этом специфические области мозга дренируются специфическими венами (как и в случае с артериями). Наружные церебральные вены, берущие начало на латеральной поверхности полушарий, соединяются, образуя поверхностную церебральную вену.

Постоянное снабжение мозга высоко оксигенированной крови является совершенно необходимым условием его нормального функционирования, а понижение давления в артериях или оксигенации крови (содержание кислорода в процентах) может вызвать серьезные повреждения мозга. В ряде случаев (в зависимости от наличия других факторов) недостаточное снабжение мозга кислородом может приводить к тяжелым поражениям его или смерть через 2—10 мин. Кратковременная потеря сознания (синкоп) также очень часто связана с острой ишемией мозга. Уровень церебрального кровотока (ЦКТ) зависит от ряда факторов, таких как вязкость крови, просвет мозговых сосудов и давление крови в них. Последнее, со своей стороны, зависит от величины системного и внутричерепного давлений. Церебральные сосуды способны самостоятельно изменять ток крови ауторегуляцией; они сокращаются (суживаются), когда АД повышается и расширяются при его понижении. Артериолы также суживаются и расширяются в ответ на различные концентрации кислорода,  $CO_2$  и других факторов.

Церебральное перфузионное давление (ЦПД) представляет собой градиент давления, обеспечивающий кровоток в мозге. Так же как церебральный кровоток, уровень ЦПД должен поддерживаться в узких границах возможных колебаний, поскольку слишком низкое ЦПД может вызвать ишемию мозговой ткани, а слишком высокое — увеличение внутричерепного давления (ВЧД).

Центральное перфузионное давление может быть представлено следующим образом:

$$\text{ЦПД} = \text{СПД} / \text{ЦСС}$$

где:

СПД — системное перфузионное давление;

ЦСС — церебральное сосудистое сопротивление.

При этом три различных вида давления участвуют в определении ЦПД: среднее системное артериальное давление (ССАД), внутричерепное давление (ВЧД) и югулярное венозное давление (ЮВД).

В большинстве тканей церебральное перфузионное давление представляет собой разницу между системным АД и венозным давлением. В некоторых других тканях необходимо учитывать давление, наружное по отношению к церебральным сосудам, если это давление достаточно высокое, чтобы могло препятствовать току крови. Такая ситуация известна, как фактор сопротивления Старлинга. Она имеет место в головном мозге, где наружное давление — это внутричерепное давление. Поэтому, правильное определение центрального перфузионного давления должно быть представлено более полным, более корректным уравнением:

$$\text{ЦПД} = \text{ССАД} - \text{ВЧД} \quad (\text{если ВЧД выше давления в югулярной вене})$$

или:

$$\text{ЦПД} = \text{ССАД} - \text{ЮВД} \quad (\text{если ЮВД выше ЦПД}).$$

В нормальных условиях жизнедеятельности (уровень ССАД между 60 и 150 мм рт. ст. и ВЧД около 10 мм рт. ст.) церебральное перфузионное давление относительно постоянно, благодаря механизму ауторегуляции. За пределами этих границ повышение ССАД повышает системное перфузионное давление, а повышение ВЧД понижает его (это одна из причин возможной смерти при увеличении ВЧД в травмированном мозге).

Центральное перфузионное давление равняется в норме 70—90 мм рт. ст. у взрослого человека и не может опускаться ниже 70 мм рт. ст. в течение более или менее длительного времени, не вызывая ишемических поражений мозга. У детей это давление должно быть ниже 60 мм рт. ст.

## 2. Сосудосуживающие и сосудорасширяющие факторы регуляции мозговых сосудов

Регуляция церебрального кровотока осуществляется главным образом с помощью синтезируемых и выделяемых эндотелием сосудов вазодилататоров: оксида азота (NO), простаглицина ( $PGI_2$ ), простагландина  $E_2$  ( $PGE_2$ ), гиперполяризующего фактора (ГПФ), монооксида углерода (CO) и сульфида водорода. В нормальных условиях выделение NO преобладает в крупных церебральных артериях, в то время как ГПФ играет более существенную роль в менее

крупных артериях и артериолах. ПГ<sub>2</sub> не принимает активного участия в регуляции базального тонуса мозговых сосудов у взрослых субъектов, но является важным фактором этой регуляции в период развития организма. Церебральные вазоконстрикторы эндотелин-1 (ЭТ-1), тромбоксан А<sub>2</sub> (ТхА<sub>2</sub>). ПГФ<sub>2α</sub> также не участвуют в регуляции тонуса мозговых сосудов в нормальных условиях, но их значение резко возрастает при ряде заболеваний [9].

Оксид азота играет ведущую роль в регуляции мозгового кровообращения. Конститутивные изоформы (NO-синтазы) (NOS) — nNOS и eNOS обнаружены в нейронах и церебральных сосудах соответственно [4]. В отличие от этих изоформ, iNOS в норме не экспрессируется головным мозгом, но ряд стимулов и патологических состояний (липополисахариды, гипертония и др.) вызывают ее экспрессию как в нейронах, так и в кровеносных сосудах [21].

В нормальных условиях выделение NO является основным регулятором базального кровотока в церебральных сосудах. Поэтому, торможение NOS сужает эти сосуды *in vivo* и *in vitro*, понижая кровоток в них. Основным источником сосудистого NO является эндотелиальная NOS (eNOS) [5]. Оксид азота, синтезируемый и локализованный нейрональной NOS (nNOS) в паренхиматозных нейронах и периваскулярных сосудах также принимает активное участие в регуляции церебрального кровотока [13], однако относительное значение eNOS более существенно.

Регуляция eNOS является сложным многофакторным процессом [4]. В церебральных сосудах, как и в сосудах других областей, eNOS первично локализована в кавеолах плазматической мембраны, структурным белком которых является кавеолин-1 [39]. Связывание последнего с eNOS тормозит продукцию ею NO. Кальций вытесняет eNOS из комплекса с кавеолином и активирует ее. Продуцируемый eNO синтазой NO поступает путем диффузии в гладкие мышцы церебральных сосудов, где стимулирует растворимую гуанилат циклазу, повышая содержание цГМФ. Последний активирует протеин киназу G, вызывая релаксацию гладких мышц сосудов путем открытия калиевых каналов и/или уменьшая чувствительность контрактильных структур к кальцию [27]. Этот механизм является преобладающим в вызываемом оксидом азота расширении церебральных артерий и артериол.

В церебральных артериях активность eNOS регулируется и белками теплового шока (БТШ) [43, 70], а также фосфорилированием серин/треонина и тирозина. Показательно, что БТШ и eNOS колокализованы в эндотелиальных клетках. Ингибитор БТШ гелданамицин понижает содержание цГМФ и вызывает сокращение церебральных артерий в такой же

степени, как и торможение NOS. Следовательно, БТШ может участвовать в регуляции базальной продукции NO [70].

Среди других эндогенных регуляторов уровня NO в церебральных сосудах следует отметить *эстроген*, который увеличивает базальную и вызываемую агонистами продукцию NO [22], регулируя соответствующим образом экспрессию и активность eNOS [62]. Эстроген увеличивает экспрессию eNOS, но понижает таковую кавеолина-1, что ведет к повышению активности eNOS. Кроме того, эстроген может активировать сигнальную систему Fl-3 киназу-Акт-eNOS в церебральных сосудах. Таким образом, эстроген оказывает существенное влияние на продукцию NO, запуская несколько контрольных звеньев в механизмах регуляции активности и экспрессии eNOS.

Вскоре после того, как было установлено, что NO является сосудорасширяющим фактором, синтезируемым и выделяемым эндотелием, был открыт другой эндотелий-зависимый вазодилататор, получивший название *эндотелиального гиперполяризующего фактора* (ЭГПФ) [17]. Опосредуемая им вазодилатация возникает независимо от NOS или метаболитов циклооксигеназы и характеризуется как эндотелий-зависимая гиперполяризация сосудистых гладких мышц с активацией калиевых каналов. Агонисты, которые вызывают опосредуемые ЭГПФ реакции, такие, как АТФ, расширяют церебральные артерии *in vitro* после торможения NOS и COX.

Переход вызываемой ЭГПФ гиперполяризации эндотелия в гиперполяризацию сосудистых гладких мышц и последующее расширение церебральных и периферических артерий осуществляется через особые белковые соединения эндотелиальных клеток с клетками сосудистых гладких мышц, локализованные в зазорах между ними (*gap junctions*) [64]. Допускается также выделение эндотелием не идентифицированного пока фактора диффузии в ответ на гиперполяризацию, что вызывает релаксацию гладких мышц. Показано, что механизмы вызываемой эндотелиальным гиперполяризующим фактором дилатации варьируют среди различных видов животных и сосудистых областей; возможно даже между различными стимулами в пределах одного и того же церебрального сосуда [17].

Есть все основания полагать, что ЭГПФ дополняет выделяемый эндотелием NO в регуляции церебрального кровообращения. Во-первых, имеются данные о том, что ЭГПФ становится более важным фактором этой регуляции по мере того, как диаметр церебральных сосудов уменьшается [71]. Например, вызываемая АТФ вазодилатация в изолированных артериолах целиком опосредуется ЭГРФ без какого-либо участия NO [71]. Однако положение о том,



что NO играет менее существенную роль в церебральных сосудах небольшого диаметра, касается не всех возможных агонистов. Ацетилхолиновая вазодилатация опосредуется почти исключительно оксидом азота в пинальных (мягкой мозговой оболочки) артериолах [30]. Во-вторых, вызываемая ЭГПФ вазодилатация увеличивается после перенесенного инсульта и травматических поражений мозга, в то время как опосредуемая эндотелиальным NO вазодилатация резко понижается. Таким образом, в условиях патологии повышение уровня ЭГПФ может компенсировать нарушенные в этих условиях функции системы NO и поддерживать церебральный кровоток. Из всего сказанного следует, что ЭГПФ играет важную роль в регуляции церебрального кровотока, что ранее недооценивалась.

Высвобождаемая фосфолипидом А<sub>2</sub> из мембранных фосфолипидов арахидоновая кислота подвергается метаболизму под влиянием циклооксигеназы (СОХ), липоксигеназы, эпоксигеназы в зависимости от типа клеток, физиологических или патологических состояний [7]. Три изоформы СОХ экспрессируются в нейронах, глии и церебральных сосудах [40]. Принято считать, что СОХ-1 экспрессируется конститутивно, а также под влиянием таких стимулов, как напряжение сдвига (продвижение крови в сосудах и трение ее о стенки этих сосудов — shear stress) и эстроген [22, 62]. СОХ-2 экспрессируется в мозговой ткани и цереброваскулярном эндотелии при воспалении и других состояниях, включая оксидативный стресс [6,7]. Открытая же недавно изоформа СОХ-3 экспрессируется в больших количествах в головном мозге, прежде всего в церебральных сосудах [53].

В нормальных условиях *простаглицлин* и *ПГЕ<sub>2</sub>* являются главными метаболитами СОХ в эндотелии сосудов, в том числе мозговых. Наиболее полно и всесторонне изученным метаболитом церебральных сосудов является простаглицлин (ПГ<sub>I<sub>2</sub></sub>). После его синтеза он диффундирует в гладкие мышцы сосудов, в которых активирует аденилатциклазу через сопряженные с G белком рецепторы, увеличивая содержание цАМФ и активность протеин киназы А [16]. Активация последней открывает калиевые каналы и вызывает гиперполяризацию сосудистых гладких мышц. Вольтаж-чувствительные кальциевые каналы закрываются, понижая концентрацию кальция и расширение сосудов. Опосредуемые эндотелием реакции у новорожденных включают в первую очередь метаболиты СОХ, но по мере развития организма значение NO в осуществлении эндотелием вазодилатации все более увеличивается [72]. У взрослых субъектов эта дилатация опосредуется главным образом NO [72].

Продукты эпоксигеназного пути окисления СОХ арахидоновой кислоты синтезируются в астроцитах и могут участвовать в процессе сопряжения кровотока и нейрональной активности.

В течение нескольких часов после травмы головного мозга содержание тромбксана А<sub>2</sub> (ТхА<sub>2</sub>) (сосудосуживающего метаболита арахидоновой кислоты) повышается [71]. Повышение уровня ТхА<sub>2</sub> ассоциируется с сужением сосудов, которое наступает после реперфузии, так как его содержание остается нормальным после одной только ишемии, но повышается после ишемии-реперфузии. Индукция СОХ-2 происходит в эндотелии и других типах клеток после повреждения мозга. СОХ-1 может участвовать в минимизировании ишемического уменьшения кровотока, в то время как индукция СОХ-2 после повреждения мозга оказывает негативное влияние на биосинтез эйкозаноидов, несмотря на то, что последние могут способствовать вазодилатации и используются в терапевтических целях. Например, инфузия ПГ<sub>I<sub>2</sub></sub> при болезнях головного мозга увеличивает кровоток и уменьшает повреждение нейронов [15]. Аналогичные эффекты оказывают и селективные ингибиторы СОХ-2 [8, 20].

Исключительно мощным вазодилататором в головном мозге является открытый в 1982 г. нейропептид *кальцитонин* [18]. В этом отношении он превосходит в 10 раз простаглицлины, в 100 раз ацетилхолин и в 100—1000 раз такие классические вазодилататоры, как аденозин, серотонин и субстанция Р, причем его действие длится несколько часов, т.е. больше, чем у любого из отмеченных соединений. Кроме того, он ограничивает вызываемое норадреналином сужение мозговых сосудов, участвует в механизмах ауторегуляции, развитии реактивной гиперемии и в других процессах. Интерес представляет взаимодействие кальцитонина с оксидом азота и простаглицлинами (простаглицлином, ПГЕ<sub>2</sub>). Показано, что нанесение NO-донора на твердую мозговую оболочку увеличивает выделение кальцитонина и кровотока в ней, а предварительная аппликация на эту оболочку антагониста рецепторов кальцитонина CGRP8-37 резко уменьшает данный эффект NO. Ингибиторы циклооксигеназы ацетилсалициловая кислота и метимизол такого влияния на эффект NO не оказывают. Был сделан вывод о том, что повышение менингеального кровотока оксидом азота частично опосредуется вазодилататорным действием кальцитонина [19, 46].

В 1988 г. был открыт сильный сосудосуживающий фактор *эндотелин-1* (ЭТ-1) [65]. Вскоре после этого была обнаружена экспрессия двух рецепторов для ЭТ-1 — ЭТ<sub>а</sub> и ЭТ<sub>б</sub> в эндотелии и гладких мышцах сосудов [69]. ЭТ-1 синтезируется в эндотелии из двух неактивных предшественников — пре-

проэндотелина и проэндотелина. Хотя активность ЭТ-1 варьирует в различных сосудах, он резко суживает большие и малые артериолы, главным образом через ЭТ<sub>А</sub> рецепторы [65]. В зависимости от концентрации ЭТ-1 и типа церебральных сосудов он может вызывать и вазодилатацию через ЭТ<sub>В</sub> рецепторы [69]. Например, низкие концентрации ЭТ-1 расширяют пиальные артериолы, но не делают этого с базиллярной артерией. Вызываемая ЭТ-1 вазодилатация опосредуется эндотелиальным NO [69].

В нормальных условиях ЭТ-1 не участвует в регуляции церебрального кровотока, указывая на то, что в таких условиях ЭТ-1 не выделяется эндотелием церебральных сосудов. Однако при патологических состояниях система ЭТ-1 активируется и может способствовать возникновению дисфункции эндотелия после ишемии-реперфузии и субарахноидальной геморрагии [5]. Содержание ЭТ-1 увеличивается после вызываемых реперфузией нарушений, что ведет к повышенной вазоконстрикции и нарушению дилатации пиальных артериол [9]. Сужение сосудов может быть опосредовано частично зависимым от протеин киназы С подавлением функции чувствительных к АТФ калиевых каналов [50]. ЭТ-1 может также опосредовать вызываемое гипероксией сужение пиальных артерий. Кроме того, ЭТ-1 участвует в дисфункции церебральных артерий при диабете.

### 3. Сосудистый эндотелий и нейрососудистое сопряжение в головном мозге

В связи с обсуждаемой здесь проблемой, необходимо особо подчеркнуть два основополагающих положения.

На протяжении более 100 лет сосудистый эндотелий рассматривался лишь как неактивная подкладка кровеносных сосудов и инертная стенка капилляров. В настоящее время он признан активной метаболической системой, поддерживающей сосудистый гомеостаз путем осуществления ряда важнейших функций, в том числе регуляцию сосудистого тонуса и кровотока, ангиогенеза, воспаления, тромбоза и других. Это касается всех отделов сосудистого русла, включая церебральную циркуляцию. Об этом свидетельствует синтез и выделение церебральным сосудистым эндотелием ряда вазоактивных соединений, в том числе большинства упомянутых выше. Эндотелиальные клетки, кроме того, создают плотные соединения, формирующие гематоэнцефалический барьер. Отмеченные и ряд других функций сосудистого эндотелия, а также его дисфункции, делают его в настоящее время центральной проблемой физиологии и патологии сердечно-сосудистой системы.

Нормальное функционирование мозга требует адекватного (своевременного и строго локализованного) снабжения кислородом и глюкозой. Это осуществляется координированными коммуникациями между нейронами, астроцитами и микрососудами с тем, чтобы обеспечить быстрое и ограниченное участком активированных нейронов повышение церебрального кровотока. Этот сложный процесс получил название «нейрососудистого сопряжения». Механизм сопряжения кровотока с активностью нейронов подвергается интенсивным исследованиям в настоящее время. Анатомические взаимоотношения между нейронами, астроцитами и артериолами создают условия для повышения кровотока только в областях повышенной активности [31]. Полагают, что при повышенной нейронной активности выделяемые астроцитами и нейронами медиаторы должны действовать на гладкие мышцы сосудов таким образом, чтобы вызвать их дилатацию или сужение [56]. Такая интерпретация вначале представлялась во многом интуитивной, так как астроциты считались закрытыми. Впоследствии, однако, было показано, что медиаторы нейронов и/или астроцитов могут проникать сквозь сосудистые гладкие мышцы и стимулировать рецепторы на наружной поверхности эндотелиальных клеток [29]. Стимуляция эндотелиальных рецепторов принимает далее участие в осуществлении нейронально опосредуемой дилатации путем выделения NO, ЭГПФ и/или ПП<sub>2</sub>. Сосудорасширяющие агенты, с наружной стороны пиальных артериол, стимулируют рецепторы эндотелия [29]. Астроциты также могут вызывать эндотелий-зависимую дилатацию путем выделения липоксигеназных продуктов. В последнее время были открыты особые, специализированные астроциты («astrocyte end-feet»), которые тесно контактируют с нейронными синапсами и сосудами. Они посылают вазоактивные сигналы (сосудосуживающие и сосудорасширяющие) и в настоящее время рассматриваются, как ключевые медиаторы нейрососудистых сопряжений [32].

Необходимо отметить, что увеличение кровотока в капиллярах, как в головном мозге, так и а периферии, требует комплексной координации процессов в пределах всей сосудистой сети. Расширение просвета сосудов в целом зависит не только от расширения артериол, снабжающих капилляры кровью, но также от дилатации более крупных, расположенных вверх по течению (upstream), артериол и артерий [68]. Дилатация этих церебральных сосудов происходит вслед за стимуляцией нейронов. Эндотелий церебральных сосудов играет важную роль в опосредовании данной дилатации, проводя ее вдоль сосудов к их выше расположенным сегментам. В соответствии с этим положением, локальное нанесение АТФ к артериолам вызы-

вает как локальную вазомоторную реакцию, так и дилатацию выше расположенных сегментов церебральных сосудов [36].

Роль эндотелия в проведении сигналов на расстояние более чем на 1 мм имеет большое значение для дилататорных реакций церебральных сосудов. Изменения диаметра капилляров могут опосредоваться перипицитами, после чего дилататорный сигнал проводится вдоль эндотелия из капилляров к артериолам, где опосредует дальнейшее расширение сосудов. Такая «перенесенная» дилатация церебральных сосудов увеличивает нейрососудистое сопряжение. Представления о том, как нейроны, глия и сосуды взаимодействуют между собой в контексте о «нейрососудистой единице» постоянно расширяются и углубляются.

#### 4. Ауторегуляция церебрального кровотока

Увеличение внутрисосудистого давления в небольших, оказывающих сопротивление кровотоку артериях и артериолах, вызывает их сокращение [14, 25]. Эта реакция, получившая название «миогенной», возникает независимо от эндотелия, нейрогенных и гуморальных факторов и является внутренне присущей гладкомышечным клеткам [14]. Миогенная реакция играет ведущую роль в осуществлении циркуляторной ауторегуляции кровотока и в определении его базального уровня. Ее механизмы развития состоят из ряда сложных внутриклеточных процессов. Эта, зависящая от давления «механоауторегуляция» (точнее «механоауторегуляция») нарушается только при очень резких изменениях уровня АД (за пределами 60—160 мм рт. ст.), а также в ответ на изменения концентрации  $CO_2$  [45]. Другая форма ауторегуляции церебрального кровотока («хемоауторегуляция») связана с  $CO_2$  и играет важную роль при различного рода метаболических пертурбациях, независимых от колебаний АД [45]. Например, церебральный кровоток увеличивается на 50% при гиперкапнии и уменьшается на 25% при гипервентиляции (усилении дыхания), вызывающей гипокапнии. Следует отметить, что при резком повышении или понижении артериального давления, ауторегуляция нарушается, что необходимо иметь в виду при назначении гипотензивной терапии [42].

Обсуждая механизмы отмеченных двух форм ауторегуляции церебрального кровотока (ЦКТ), необходимо, прежде всего, сказать, что активация вегетативной нервной системы крайне незначительно влияет на ЦКТ, несмотря на наличие адренорецепторов в церебральных сосудах [37]. Показано, что изолированные пиальные (мягкой мозговой оболочки) артерии человека незначительно иннервированы и обладают слабой реактивностью к агонистам адреноре-

цепторов. Больные с резко выраженной недостаточностью вегетативной нервной системы сохраняют свою механоауторегуляцию, несмотря на поражение ее волокон. Блокировка вегетативных ганглиев, а также активация альфа-2 и альфа-1 адренорецепторов не изменяли сколько-нибудь существенно механорегуляцию у здоровых добровольцев [37]. Адреномиметик фенилэфрин же увеличивает региональное сопротивление церебральных сосудов, но не вызывал понижение ЦКТ.

Оксид азота также незначительно влияет на механоауторегуляцию ЦКТ [47]. NO-донор нитропруссид натрия, например, вызывает существенное уменьшение базального сопротивления церебральных сосудов, но при этом их реакция на фенилэфрин, изменения уровня АД и ЦКТ остаются неизменными. Инфузия этого NO-донора в каротидную артерию не изменяет показатели церебрального кровотока, регистрируемые в период инфузии фенилэфрина [38]. Эти и другие данные свидетельствуют о том, что NO не принимает активного участия в механоауторегуляции ЦКТ. Есть все основания полагать, что главным механизмом этой регуляции является миогенная реакция гладких мышц церебральных сосудов.

Имеются, однако, и другие данные, свидетельствующие о роли NO в механоауторегуляции церебрального кровотока, связанной с миогенной реакцией мозговых сосудов и взаимосвязью NO с кавеолином в кавеолах плазматической мембране [24, 54]. Было установлено, что белок кавеолы кавеолин-1 уменьшает миогенное сокращение сосудов в широком диапазоне внутрисосудистого давления церебральных артерий [50]. Подавленное миогенное сужение артерий, лишенных кавеолина-1, является результатом уменьшения давлением деполяризации и вызываемого ею увеличения уровня  $Ca^{2+}$ , причем оба эти изменения ослабляют последующее увеличение уровня кальция в артериальной стенке [54]. Таким образом, экспрессия кавеолина-1 и связь его с NOS необходима для того, чтобы внутрисосудистое давление могло вызывать полное миогенное сужение церебральных сосудов [27, 27a]. Из сказанного вытекает, что NO играет существенную роль в определении миогенного тонуса этих сосудов и механоауторегуляции, так как связь NO с кавеолином-1 резко уменьшает выделение NO из кавеол.

Что касается хемоауторегуляции, то роль вегетативной нервной системы при ней также незначительна, как и при механоауторегуляции, хотя может быть несколько более существенна, чем при механоауторегуляции. Однако, у больных с резко выраженной недостаточностью вегетативной нервной системы, обусловленная гипервентиляцией гипокапния может вызвать резкое падение АД. Из этого можно за-

ключить, что вегетативная нервная система играет определенную роль в поддержании уровня АД при гипокапнии. Однако, введение ганглиоблокаторов, вызывающее существенное изменение системной гемодинамики, лишь незначительно влияет на церебральный кровоток при гипокапнии у здоровых людей [37]. Следовательно, симпатическая нервная система все же слабо участвует в модуляции церебрального кровотока  $\text{CO}_2$ . Основную роль в этом процессе играет, как оказалось, NO. Экспериментальные исследования на животных показали, что NO принимает участие в зависимой от  $\text{CO}_2$  вазомоторной активности. Ингибитор NOS L-NAME увеличивает сопротивление церебральных сосудов и тормозит реакцию на гиперкапнию. Другой ингибитор NOS — L-NMMA понижает церебральный кровоток и ослабляет вазомоторные реакции на гиперкапнию [44]. Показано, кроме того, что увеличение церебрального кровотока в ответ на гиперкапнию полностью блокируется инфузией ингибитора NOS в каротидную артерию. Кроме того, эффект L-NMMA на региональный церебральный кровоток линейно коррелирует с  $\text{CO}_2$  и может быть устранен L-аргинином [47].

Интересно отметить, что в ранние утренние часы после пробуждения имеет место уменьшение цереброваскулярной реактивности к  $\text{CO}_2$  и/или функции эндотелия, что нарушает хемоауторегуляцию и создает повышенный риск сердечно-сосудистых нарушений в это время суток. Было установлено, что с вечера и до утра происходит понижение динамической церебральной ауторегуляции, эндотелий-зависимой вазодилатации и цереброваскулярной реактивности к  $\text{CO}_2$ . Пониженная эндотелий-зависимая вазодилатация связана с понижением реактивности мозговых сосудов к  $\text{CO}_2$ . Имеет место временное уменьшение утром скорости кровотока в средней мозговой артерии и кортикальной оксигенации при переходе от клино- в ортостаз по сравнению с данными, полученными вечером (накануне). Создается, иначе говоря, ситуация, при которой уменьшение церебральной ауторегуляции рано утром может способствовать возникновению цереброваскулярных инцидентов, особенно при переходе от клино- в ортостаз.

Следует также сказать, что в условиях хронической системной артериальной гипертензии происходит сдвиг диапазона уровней АД, в котором мозг осуществляет ауторегуляцию своего кровотока, что необходимо иметь в виду при назначении гипотензивной терапии таким больным, а также при других гипертензивных и гипотензивных воздействиях эндогенной и экзогенной природы [12].

## 5. Газообразные факторы регуляции церебральной циркуляции

Обсуждая механизмы регуляции оксидом азота церебрального кровообращения, необходимо иметь в виду его взаимодействия с другими вазотропными соединениями. Кроме простаноидов, гиперполяризующего фактора, аденозина и некоторых других, о которых подробно говорилось выше, несомненный интерес представляют газообразные факторы. Среди них большое внимание в последние годы привлекают углеродная монооксид (CO) и сульфид водорода ( $\text{H}_2\text{S}$ ) [57]. CO расширяет церебральные сосуды при активной гиперемии, ауторегуляции, противодействует вазоконстрикторным эффектам. Она продуцируется в гемме конститутивно экспрессируемым ферментом гемм оксигеназой (HO-2), которого много в головном мозге и индуцируемым ферментом HO-1. Эта продукция регулируется контролируемой доступностью субстрата, каталитической активностью HO-2 и экспрессией HO-1. CO расширяет артериолы, взаимодействуя с геммом, который, со своей стороны, связывается с  $\text{Ca}^{2+}$  активруемыми ВК-Са каналами, увеличивающими сопряжение  $\text{Ca}^{2+}$  с открытием ВК-Са каналов. Последние гиперполяризуют гладкие мышцы сосудов, вызывая вазодилатацию.

Сульфид водорода также функционирует, как дилататор церебральных сосудов. Он продуцируется в их гладких мышцах путем катализируемого ферментом CSE гидролиза L-цистеина. Сульфид водорода расширяет артериолы в физиологических концентрациях способствуя активации NO синтазой K (ATФ) каналов. Кроме того, он тормозит апоптоз сосудистых гладкомышечных клеток и связанное с их пролиферацией ремоделирование сосудов. Таким образом, углеродная монооксид и бисульфид водорода модулируют функции и структуру мозговых сосудов. Было установлено, что системы HO/CO и CSE/ $\text{H}_2\text{S}$  взаимодействуют с NO и другими вазодилататорами в регуляции церебральной циркуляции [57].

Группа газовых аутокринных-паракринных мессенджеров (передатчиков) продолжает увеличиваться и в настоящее время включает, кроме NO, CO и  $\text{H}_2\text{S}$ , несколько молекул из подгруппы реактивных форм кислорода (РФК). С поразительной скоростью открываются все новые и новые функции этих молекул, указывая на то, что газовые аутокринные-паракринные передатчики имеют исключительно важное значение в физиологии и патологии позвоночных, а может быть и всех живых организмов. Они используются организмом для осуществления высокоспецифических внутри- и внеклеточных коммуникаций во многих, если не во всех, органах и системах.

В то время как газовые передатчики функционируют аналогично гормонам, нейротрансмитерам и липидным медиаторам, они обладают рядом особенностей. Поскольку эти молекулы растворимы в липидах, они не захватываются и не задерживаются клеточными мембранами. Депонирование их в везикулах для более позднего выделения по мере необходимости не имеет места, хотя считается, что CO и NO связываются с гемм-содержащими белками, которые могут подвергаться индукции с последующим выделением передатчика. (NO может стабилизироваться путем включения в диитрозольные комплексы железа с тиоловыми лигандами и S-нитратиолами, образуя депо в тканях) [1, 3, 10]. Основная же передача сигналов газопередатчиками осуществляется путем их синтеза *de novo*. Так как они дифундируют вдоль парциального градиента давления и не захватываются (не задерживаются) клеточными мембранами, специфическое поглощение или метаболизирующие процессы, направленные на прекращение передаваемых ими сигналов, не существует. Это происходит путем падения концентрации газопередатчика из-за уменьшения его продукции, вызываемого реакцией с другими компонентами клетки (в частности, с РФК и NO) или же путем диффузии в другие клетки и межклеточное пространство. Природа взаимодействия газопередатчиков с их рецепторами только начинает изучаться, не считая NO и гуанилат циклазы, в отношении которых уже многое выяснено.

## 6. Влияние функциональных нагрузок на кровообращение в головном мозге

Как уже говорилось, ауторегуляция церебрального кровотока осуществляется путем сложного взаимодействия миогенных, нейрогенных, метаболических процессов. Этот сложный комплекс ауторегуляторных механизмов основывается на плотном сопряжении метаболических требований мозговой ткани и ее снабжения кислородом, глюкозой, другими жизненно необходимыми ресурсами. При постоянных значениях этих двух параметров, изменения АД компенсируются соответствующими сдвигами тонуса сосудов. С другой стороны, уменьшение доставки кислорода или увеличение требований метаболизма вызывают понижение сосудистого тонуса, что ведет к увеличению церебрального кровотока с тем, чтобы удовлетворить требования ткани мозга в необходимых количествах кислорода. Основную роль в осуществлении сопряжения между снабжением мозга кислородом и тонусом церебральных сосудов играет NO.

Для более полной оценки роли NO в регуляции церебрального кровотока необходимо было изучить особенности этой регуляции в условиях, являющихся

дополнительной (но вместе с тем биологически адекватной, встречающейся в повседневной жизни) нагрузкой на соответствующие регуляторные механизмы. Такие условия нередко возникают при гипоксии, гипер- и гипокапнии, ацидозе. Показано, что все эти воздействия вызывают дилатацию церебральных сосудов и повышение кровотока в них, обусловленные метаболическими требованиями мозговой ткани и опосредованные увеличенной продукцией NO.

На различных видах животных в людях было показано, в частности, что ингибиторы NOS уменьшают вызываемую гипоксией вазодилатацию. На молодых здоровых добровольцах показано [11], что введение ингибитора NOS L-NMMA не оказывает влияния на церебральный кровоток при нормальном уровне кислорода в крови (нормоксии), в то время как гипоксия увеличивает кровоток в головном мозге. В соответствии с этим, церебральное сосудистое сопротивление понижается при гипоксии и восстанавливается после введения L-NMMA. Используя магнитно-резонансный метод, авторы установили, что вызываемое гипоксией расширение мозговых сосудов у людей опосредуется оксидом азота который опосредует сопряжение доставки кислорода в мозговой ткани и тонус церебральных сосудов.

### 6.1. Гиперкапния и гипокапния, гипероксия и гипоксия, оксид азота

Церебральный кровоток исключительно чувствителен к изменениям парциального давления углекислого газа в артериальной крови. Общеизвестным является положение о том, что гиперкапния вызывает расширение церебральных сосудов и увеличение кровотока в головном мозге, а гипокапния — церебральную вазоконстрикцию и снижение кровотока в головном мозге. Показано, что церебральный кровоток увеличивается на 50% при гиперкапнии и уменьшается на 25% при гипокапнии, вызванной гипервентиляцией (усилением дыхания) [55].

Установлено, что гиперкапнический и нормокапнический ацидоз также вызывают расширение церебральных сосудов; и снижение внутриклеточного pH играет важную роль в вызываемой ацидозом вазодилатации [48], а концентрация углеродных ионов является одним из регуляторов этой реакции. Имеются убедительные данные о том, что nNOS и eNOS участвуют в вызываемой ацидозом дилатации церебральных сосудов.

В отношении участия eNO в вызываемой ацидозом вазодилатации следует иметь в виду два возможных механизма:

1) ацидоз увеличивает продукцию NO, так как он активирует NOS [67];

2) ацидоз защищает спонтанно выделяемый NO от разрушения, так как он стабилен в кислой среде.

По мнению некоторых авторов [49], в церебральной циркуляции NO действует и как усилитель, а не как только медиатор вызываемой ацидозом вазодилатации. Поскольку NO выделяется в базальных условиях и регулирует тонус церебральных артериол [36], возможно, что ацидоз увеличивает действие и базального NO, вызывая расширение артериол.

Таким образом, eNO принимает активное участие в ацидотической вазодилатации церебральных артериол [59]. С клинической точки зрения данный факт заслуживает внимания, поскольку такие патологические состояния, как субарахноидальное кровоотечение или травматическое повреждение мозга могут вызывать дисфункцию эндотелия и церебральный ацидоз [35]. Отсутствие или недостаточно выраженная в этих условиях эндотелиальная рН реакция понижает микрососудистую дилатацию и может способствовать возникновению церебральной гипоперфузии, что имеет место при отмеченных патологических состояниях, несмотря на вызываемый ими ацидоз.

### *6.2. Различная чувствительность к гиперкапнии центрального и периферического кровотока*

Парциальное давление CO<sub>2</sub> является мощным регулятором кровотока и в периферических сосудах [55]. Однако соответствующие эффекты коренным образом отличаются от тех, которые возникают в головном мозге, что имеет важное значение с точки зрения обсуждаемой здесь проблемы.

В 1932 г. Lenox и Gibbs [58] сообщили о различиях между церебральной и бедренной циркуляцией в реакциях на гиперкапнию. Последняя увеличивала ток крови в головном мозге, но уменьшала его в нижних конечностях. В дальнейшем было показано, что гиперкапния увеличивает циркуляцию как в головном мозге, так и в нижних конечностях, но в головном мозге в 8 раз больше, чем в нижних конечностях [12]. Такие же примерно данные были получены при сравнении чувствительности к гиперкапнии церебральной и плечевой циркуляции [66]. Это можно легко понять, если учесть, что поддержание оксигенации в мозговой ткани является исключительно важным для жизнедеятельности организма, в целом. Вместе с тем, это создает большой риск возникновения различного рода нарушений в нервных клетках головного мозга при небольших изменениях парциального давления углекислого газа в нем. Следует иметь в виду также, что находящиеся в условиях физиологического покоя мышцы (в том числе сосудистые) обнаруживают низкую активность обмена веществ и метаболические требования к снабжению кислородом по сравнению с нейронами, которые являются одними из наиболее метаболически активными клетками в организме не

велики. Поэтому адаптация периферической циркуляции к гиперкапнии наступает быстрее. В исследованиях Ventamejan с соавторами [66] к 60-й минуте после начала гиперкапнии кровотоков в верхних конечностях понижался существенно, в то время как в головном мозге он оставался повышенным какое-то время и после 60-й минуты (т.е. после устранения гиперкапнии).

Учитывая роль NO и простаглицлина в расширении сосудов, логично думать, что отмеченные различия между реакциями церебральной и периферической циркуляции на гиперкапнию обусловлены различной биодоступностью этих соединений в указанных областях сосудистого русла. Поэтому, очевидно, адаптация периферической циркуляции к гиперкапнии наступает быстрее, чем в церебральной. Другой важный механизм отмеченных различий касается роли симпатической нервной системы в определении чувствительности церебральной и периферической циркуляций к гиперкапнии. Показано, что последняя повышает активность данной системы [60]. В отношении же физиологического значения симпатической иннервации данные расходятся. Одни авторы наблюдали повышение сопротивления церебральных сосудов при активации симпатической нервной системы, уменьшение церебрального кровотока и ослабление реакции последнего на гиперкапнию [37]. По результатам других исследований, симпатическая нервная система не оказывает влияния на сопротивление церебральных сосудов.

Значительно более определенной оказалась роль симпатической нервной системы на периферии. В период слабой гиперкапнии (5% вдыхаемого CO<sub>2</sub>) имеет место опосредуемая  $\alpha$ -адренергическими рецепторами вазоконстрикция и уменьшение кровотока. При более резкой гиперкапнии (8—30% вдыхаемого CO<sub>2</sub>) происходит вазодилатация, указывая на то, что другие регуляторные механизмы (NO, простаглицлин) подавляют симпатическую вазоконстрикцию. Ainslie с соавторами [12] показали, что вызываемая сжатием руки симпатическая вазоконстрикция не меняет церебрального кровотока, но понижает его в нижней конечности. Они привели данные о том, что повышение церебрального кровотока под влиянием гиперкапнии существенно более выражено, чем в задних конечностях. Делается вывод о том, что периферические сосуды находятся под более сильным влиянием симпатической активности. С этим согласуется большее содержание и распространение  $\alpha$ -адренорецепторов в периферических, чем в церебральных сосудах [12]. Такой механизм должен иметь существенное значение в предотвращении резкой вазодилатации в период активации скелетной мышцы, поддерживая уровень АД, а также отклонение крови к другим, более важным, для жизнедеятельности организма органам, таким как головной мозг [12].

Другим механизмом, обуславливающим неодинаковую чувствительность церебральных и периферических сосудов к гиперкапнии является постоянная разница давления в них при ортостатической позиции тела (стоя). Имеет место более выраженное торможение сосудистых реакций на эндотелий(НО)-зависимые и эндотелий-независимые вазодилататоры в ногах по сравнению с руками. Это, по-видимому, результат хронически более высокого АД в сосудах нижних конечностей, что ведет к функциональным и морфологическим различиям с сосудами рук. В соответствии с этими положениями имеет место понижение реактивности церебральных сосудов к повышенному АД у больных хронической гипертензией [60]. Выше уже подчеркивалось большое значение NO и простаглицлина в создании различной реактивности сосудов мозга и конечностей к гиперкапнии [33], а также в связи с возможными функциональными и морфологическими различиями эндотелия и гладких мышц отмеченных сосудов.

## 7. Оксидантный стресс и церебральное кровообращение

Регуляция оксидом азота тонуса мозговых сосудов и кровотока в значительной степени зависит от уровня свободных радикалов (реактивных форм кислорода — РФК), оказывающих сильное, но противоположное NO влияние на кровообращение в головном мозге. С этой точки зрения очень важно знать, возникает ли оксидативный стресс в церебральных сосудах и какова его роль в определении тонуса этих сосудов. Имеются данные о повышенном содержании супероксид аниона в стенке мозговых сосудов при вызываемой ангиотензином-2 гипертензии, гипергомоцистеинемии, резистентности к инсулину, диабете, воспалении, ишемии-реперфузии, субарахноидальном кровотечении. Эти данные имеют большое значение потому, что они касаются главных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе церебрального инсульта [28, 52, 61].

Оксидативный стресс возникает как результат нарушения баланса между реактивными формами кислорода (РФК) и защитными антиоксидантными механизмами клетки. Чаще всего он является следствием энзиматического или неэнзиматического образования супероксид аниона (предшественника многих РФК и реактивных форм азота (РФА), а также пониженной экспрессии или активности антиоксидантных ферментов, которые регулируют внутриклеточное содержание РФК [2, 9]. В настоящее время есть все основания рассматривать оксидативный стресс, как потенциально опасное для церебральной циркуляции состояние. Будучи медиатором эндотелий-зависимой

вазодилатации, NO принимает, как уже говорилось, важное участие в регуляции тонуса больших артерий и микрососудов мозга. Вместе с тем, он активно вступает в реакцию с супероксидом, что ведет к понижению уровня и биодоступности NO. Вызывая дисфункцию сосудистого эндотелия, супероксид не только тормозит зависимость от NO и активации калиевых каналов вазодилатацию [28], но и нарушает также нейрососудистое сопряжение в головном мозге. Опосредование им нарушения сигнальных функций NO и эндотелиальной регуляции сосудистого тонуса находятся в центре внимания проводимых в настоящее время базисных исследований физиологии и патологии церебрального кровообращения.

Оксидативный стресс влияет и на вазоконстрикторные механизмы. Это касается, в частности, Rho-киназы, которая рассматривается как ключевой медиатор сосудосуживающих реакций [40]. Оказалось, что это свойство Rho-киназы является следствием потери тормозящих эффектов NO на нее или же прямого усиления активности Rho-киназы реактивными формами кислорода. Активность Rho-киназы увеличивается в кровеносных сосудах мозга при ряде заболеваний, вызывая их сужение и способствуя возникновению вазоспазмов. Необходимо далее отметить, что потеря сигнальных функций NO при оксидантном стрессе выходит за рамки регуляции ими сосудистого тонуса. Хронический дефицит синтезируемого эндотелием NO вызывает гипертрофию церебральных артерий. Реактивные формы кислорода способствуют гипертрофии сосудов путем инактивации NO или прямой активации сигнальных каскадов, участвующих в росте сосудистых мышц. Показано, что дефицит CuZn-изомеразы супероксид дисмутазы (CuZn-SOD) (ключевого антиоксиданта в кровеносных сосудах) [23], увеличивает содержание супероксида, нарушает зависимые от NO сигнальные процессы и вызывает выраженную гипертрофию микрососудов мозга [34]. Такие структурные изменения могут иметь серьезные последствия, так как гипертрофия сосудистой стенки снижает их способность расширяться. Нарушения внеклеточного матрикса и структуры сосудов могут развиваться и как следствие вызываемой реактивными формами кислорода активации металлопротеиназ матрикса [52]. Увеличение же активности металлопротеиназ увеличивает проницаемость сосудов [52], их ремоделирование и способствует образованию аневризм. Рост сосудов, изменение их структуры, функций могут быть вызваны активацией и редокс-чувствительных киназ, а также факторами транскрипции, включая NF-κB, протеин активатор-1 и вызываемый гипоксией фактор-1(α) [41].

Главная трудность, которая возникает в связи с возможным воздействием на оксидативный стресс в терапевтических целях, является определение источ-

ников РФК. Наибольший интерес в этом плане вызывает NAD(P)H оксидаза — источник супероксид аниона в периферических сосудах. В отношении церебральных сосудов мало известно об относительном значении этого фермента по сравнению с другими источниками супероксида. Имеются, однако, данные о том, что NAD(P)H оксидаза экспрессируется реактивными формами кислорода и является их главным источником в церебральных сосудах при гипертонии и диабете, после церебрального инсульта, под влиянием ангиотензина-2 [51, 52].

Взаимодействие NO с супероксидом вызывает образование пероксинитрита, в том числе в церебральных сосудах. Следует отметить в связи с этим, что дисфункция этих сосудов может возникать и как результат нитрозативного стресса. Становится все более очевидным, что пероксинитрит является не только маркером данного стресса, но и медиатором повреждения клеток, в том числе церебральных сосудов. Повреждающие эффекты этого соединения включают активацию поли(АДФ)-рибоз полимеразы (другого маркера дисфункции сосудов) и металлопротеиназы матрикса. Путем нитрирования и инактивации митохондриальной изоформы СОД (Mn-SOD), а также нарушения сопряжения NOS с ее субстратом, окислительный стресс создает ситуацию, при которой NOS начинает продуцировать супероксид в церебральных сосудах, а не NO.

Необходимо подчеркнуть особо, что отмеченные и другие неблагоприятные (патогенные) эффекты окислительного стресса возможны только при высоких концентрациях РФК и РФА. Низкие же концентрации РФК функционируют как сигнальные молекулы и участвуют в нормальной регуляции церебральных сосудов.

### Список литературы

1. **Ванин А.Ф.** Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотриолы — две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах // Биохимия. — 1998. — Т. 7. — С. 224-238.
2. **Лепкин В.З., Тихазе А.И., Беленков Ю.Н.** Свободнорадикальные процессы при заболеваниях сердечно-сосудистой системы // Кардиология. — 2000. — 7. — С. 48-61.
3. **Манухина Е.Б., Смирин Б.В., Мальшев И.Ю.** и др. Депонирование оксида азота в сердечно-сосудистой системе.
4. **Марков Х.М.** NO и CO новый класс системных молекул // Успехи физиол. наук. — 1996. — 27(4). — Р. 30-48.
5. **Марков Х.М.** Молекулярные механизмы дисфункции сосудистого эндотелия // Кардиология. — 2005. — 12. — С. 62-72.
6. **Марков Х.М.** Оксидантный стресс и дисфункция эндотелия // Патол. физиол. эксп. тер. — 2005. — 4. — С. 5-10.
7. **Марков Х.М.** Простаноиды и сердечно-сосудистая система. — М.: Династия, 2006.
8. **Марков Х.М.** Взаимодействия биорегуляторных систем простаноидов и оксида азота // Патол. физиол. эксп. тер. — 2011 (в печати).
9. **Марков Х.М.** Болезни кровообращения патогенез, терапия, система NO. — М.: Полиграф. сервис, 2011.
10. **Смирин Б.В., Ванин А.Ф., Мальшев И.Ю.** и др. Депонирование оксида азота в кровеносных сосудах in vivo // Бюлл. эксп. биол. мед. — 1999. — 127(6). — Р. 629-632.
11. **Annette Y.M., Mil V., Split A.** et al. NO mediates hypoxia-induced cerebral vasodilation in humans // J. Appl. Physiol. — 2002. — Vol. 92. — P. 962-966.
12. **Ainslie P.N., Ashmead V.C., Ide K.** et al. Differential responses to CO<sub>2</sub> and sympathetic stimulation in the cerebral circulation in humans // J. Physiol. — 2005. — Vol. 566. — P. 613-624.
13. **Atochin D.N., Demchenko T.T., Astern J.** et al. Contributions of nNOS and eNOS to cerebrovascular responses to hyperoxia // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 2003. — Vol. 23. — P. 1219-1226.
14. **Bayliss W.M.** On the local reactions of the arterial wall to changes in internal pressure // J. Physiol. — 1902. — Vol. 28. — P. 220-231.
15. **Bentzer P., Venturoli D., Carlsson O.** et al. Low dose prostacyclin improves cortical perfusion following experimental brain injury // J. Neurotrauma. — 2003. — Vol. 20. — P. 477-461.
16. **Bogatcheva N.V., Sergeeva M.G., Dudek S.M., Verin A.D.** Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology // Microvasc. Res. — 2005. — Vol. 69. — P. 107-127.
17. **Brian R.M., You J., Golding E.M., Marrelli S.P.** Endothelium — derived hyperpolarizing factor: a cousin to NO and prostacyclin // Anesthesiology. — 2005. — Vol. 102. — P. 1261-1277.
18. **Brain S.D., Williams T.J., Tippins T.J.** Calcitonin related peptide is a potent vasodilator // Nature. — 1985. — Vol. 313(5997). — P. 54-56.
19. **Brian J.E., Faracu F.M., Nerstad D.D.** Recent insights in to the regulation of cerebral circulation // Clin. Experimental Physiol. — 1996. — Vol. 23. — P. 6-77.
20. **Candelario J.E., Mhadu N.H., Gonzales F.A.** et al. Wide therapeutic time window for nimesulide neuroprotection of transient focal cerebral ischemia // Brain Res. — 2004. — Vol. 1007. — P. 98-108.
21. **Carbera C.L., Bealer S.L., Bohr D.F.** Central depressor action of NO in deficient in genetic hypertension // Am. J. Physiol. — 1996. — Vol. 9. — P. 237-241.
22. **Chambliss K.L., Shaul P.W.** Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase // Endocrine Reviews. — 2002. — Vol. 23(5). — P. 665-676.
23. **Cooke J.P.** Flow, NO and atherogenesis // PNAS. — 2003. — Vol. 100(3). — P. 768-770.
24. **Danne T., Kordonouri O., Weber B.** Diabetic nephropathy in children // Med. — 1997. — Vol. 14. — P. 1012-1025.
25. **Davis M.J., Hill M.A.** Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response // Physiol. Rev. — 1999. — Vol. 79. — P. 387-423.
26. **Dimont A.S., Dimont R.J., McNeill J.H.** et al. Chronic endothelin antagonism restores cerebrovascular function in diabetes // Neurosurgery. — 2003. — Vol. 52. — P. 633-660.
27. **Drab M., Verkade P., Elger M.** et al. Loss of caveolae, vascular dysfunction and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice // Science. — 2001. — Vol. 293. — P. 2449-2452.
- 27a. **Shaw L., Sweeney M.A., O'Neill S.C.** et al. Caveolae and sarcoplasmic reticular coupling in smooth muscle cells of pressurized arteries: the relevance of Ca<sup>2+</sup> oscillations and tone // Kardiovasc. Res. — 2006. — Vol. 69. — P. 825-835.



28. **Erdos B., Simandle S.A., Suipes J.A.** et al. Potassium channel dysfunction in cerebral arteries of insulin resistant rats is mediated by reactive oxygen species // *Stroke*. — 2004. — Vol. 35. — P. 964-969.
29. **Faraci F.M., Lynch C., Lamping K.G.** Responses of cerebral arterioles to ADP: eNOS — dependent and eNOS — in dependent mechanisms // *Am. J. Physiol.* — 2004. — Vol. 287. — H2871-H2876.
30. **Faraci F.M., Sobey C.G.** Role of potassium channels in regulation of cerebral vascular tone // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 1998. — Vol. 18. — P. 1047-1063.
31. **Fellin T., Carmignoto G.** Neurone-to-astrocyte signaling in the brain represents a distinct multifunctional unit // *J. Physiol.* — 2004. — Vol. 559. — P. 3-15.
32. **Filosa J.A., Blanco V.M.** Neurovascular coupling in the mammalian brain // *Experimental pathology*. — 2007. — Vol. 92. — P. 641-646.
33. **Hattori K., Tsuchida S., Tsuchihara H.** et al. Augmentation of NO-mediated vasodilation in metabolic acidosis // *Life Sci.* — 2002. — Vol. 71. — P. 1439-1447.
34. **Haubach G.I., Didion S.P., Faraci F.M.** Deficiency of copper-zinc dismutase promotes cerebral vascular superoxide hypertrophy // *FASEB J.* — 2003. — Vol. 17. — A61-A64.
35. **Hoffman W.E., Wheeler P., Edelman G.** et al. Hypoxic brain tissue following subarachnoid hemorrhage // *Anesthesiology*. — 2002. — Vol. 92. — P. 442-446.
- 35a. **Park K.W., Metais C., Dai H.B.** et al. Microvascular endothelial dysfunction and its mechanism in subarachnoid hemorrhage // *Anesth. Analg.* — 2001. — Vol. 92. — P. 990-996.
36. **Horiuchi T., Dietrich H.H., Hongo K.** Role of eNOS and smooth muscle potassium channels in cerebral arteriolar dilation in response to acidosis.
37. **Jordan J., Shannon J.R., Diedrich A.** et al. Interaction of carbon dioxide and sympathetic nervous system activity in the regulation of cerebral perfusion in humans // *Hypertension*. — 2000. — Vol. 36. — P. 383-388.
38. **Joshi S., Young W.L., Duong H.** et al. Intracarotid nitroprussid does not augment cerebral blood flow in human subjects // *Anesthesiology*. — 2002. — Vol. 96. — P. 60-66.
39. **Okamoto T., Schlegel A., Schzerer P.E., Losani M.P.** Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing «preassembled signaling complexes» in the plasma membrane // *J. Biol. Chem.* — 1998. — Vol. 272. — P. 5419-5422.
40. **Park Y., Capobianco S., Fack J.R.** et al. Role of EDHF in type 2 diabetes-induced endothelial dysfunction // *J. Exp. Med.* — 2008. — Vol. 205(9). — P. 2053-2063.
41. **Polli G., Loonarduzzi G., Baisi F.** et al. Oxidative stress and cell-signaling // *Current Medicol. Chem.* — 2004. — Vol. 11. — P. 1163-1182.
42. **Ruland S., Aiyagari V.** Cerebral Autoregulation and blood pressure lowering. *Hypertension*. — 2007. — Vol. 49. — P. 977-981.
43. **Schleisinger M.I.** Heat Shock proteins // *J. Biol. Chemistry*. — 1990. — Vol. 265(21). — P. 12111-12114.
44. **Schmetterer L., Findli O., Strenn K.** et al. Role of NO in the O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> responsiveness of cerebral and ocular circulation in humans // *Am. J. Physiol.* — 1997. — Vol. 273. — R2005-R2012.
45. **Standgaard S., Paulson O.B.** Cerebral autoregulation // *Stroke*. — 1984. — Vol. 15. — P. 413-416.
46. **Strecker T., Dux M., Messlinger K.** Increase in meningeal blood flow by NO interaction with calcitonin related peptide receptor and prostaglandin synthetase inhibition // *Cephalalgia*. — 2002. — Vol. 22(3). — P. 233-241.
47. **Thompson B.G., Pluta R.M., Girton M.E.** et al. NO mediation of thermoregulation, but not autoregulation of cerebral blood flow in primates // *J. Neurosurg.* — 1996. — Vol. 84. — P. 71-78.
48. **Tian R., Vogel P., Lassen N.A.** et al. Role of extracellular and intracellular acidosis for hypercapnia-induced inhibition of tension of isolated cerebral arteries // *Circul. Res.* — 1995. — Vol. 76. — P. 269-275.
49. **Toda N., Okamura T.** Nitroxidergic nerve: regulation of vascular tone and blood flow in the brain // *J. Hypertens.* — 1996. — Vol. 14. — P. 423-434.
50. **Kasemsri T., Armstead W.M.** Endothelin impairs ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel function after brain injury // *Am. J. Physiol.* — 1997. — Vol. 273. — H2639-H2647.
51. **Kharana V.G., Feteric K., Springett M.J.** et al. Functional independence and colocalization of NOS and heat shock protein 90 in cerebral arteries // *J. Cereb. Blood flow Metab.* — 2000. — Vol. 20. — P. 1563-1570.
52. **Kim G.W., Gasche Y., Grzeschik S.** et al. Neurodegeneration in striatum: role of matrix metalloproteinase-9 in early blood-brain barrier disruption // *J. Neurosci.* — 2003. — 23. — P. 8733-8742.
53. **Kis B., Snipes A., Bari F., Busija.** Regional distribution of COX-3mRNA in the central nervous system // *Mol. Brain Res.* — 2004. — Vol. 126. — P. 78-80.
54. **Knot H.J., Nelson M.T.** Regulation of membrane potential and diameter by voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in myogenic cerebral arteries // *Am. J. Physiol.* — 1995. — Vol. 269. — H348-H355.
55. **Kontos H.A.** Role of hypercapnic acidosis in the local regulation of blood flow in skeletal muscle // *Circul. Res.* — 1971. — Vol. 33. — P. 98-105.
56. **Ladecola C.** Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer disease // *Nat. Rev. Neurosci.* — 2004. — 5. — P. 347-360.
57. **Leffer C.W., Parfenova H., Juggar J.** Carbon monoxide and hydrogen sulfide: gaseous messengers in cerebrovascular circulation // *J. Appl. Physiol.* — 2006. — Vol. 100(3). — P. 1065-1076.
58. **Lennox W.G., Gibbs E.I.** The blood flow in the brain and log of man and the changer induced by alteration of blood gases // *J. Clin. Invest.* — 1932. — Vol. 11. — P. 1155-1175.
59. **Lindauer U., Kunz A., Angstwurm** et al. NO from perivascular nerves modulates cerebral arterial pH reactivity // *Am. J. Physiol.* — 2001. — Vol. 281. — H1353-H1363.
60. **Macda H., Marrelli S.P., Eckmann M.S.** et al. Reactivity of cerebral blood flow to carbon dioxide in hypertensive patients // *J. Hypertens.* — 1994. — Vol. 12. — P. 191-197.
61. **Madamanchi N.R., Vendrov A., Runge M.S.** et al. Oxidative stress and vascular disease // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2005. — Vol. 25. — P. 29-38.
62. **MacRitchie A.N., Jun S.S., Chen Z.** et al. Estrogen upregulates eNOS synthase gene expression in artery endothelium // *Circul. Res.* — 1997. — Vol. 81. — P. 355-362.
63. **Miao L., Dai Y., Zhang J.** Mechanism of Rho/Rho kinase activation in endothelin-induced contraction in rabbit basilar artery // *Am. J. Physiol.* — 2002. — Vol. 283. — H983-H987.
64. **Ujiie H., Chaytor A.T., Bakker L.M.** et al. Essential role of Gap junctions in NO- and prostanoid independent relaxation evoked by acetylcholine in intracerebral arteries // *Stroke*. — 2003. — Vol. 34. — P. 544-550.
65. **Van Gruder G.P., Westby C.M., Greiner J.J.** Endothelin-1 vasoconstrictor tone increases with age // *Hypertension*. — 2007. — Vol. 50. — P. 403-410.
66. **Vantanajal J.S., Ashmed J.C., Anderson** et al. Differential sensitivity of cerebral and branchial blood flow to hypercapnia in humans // *J. Appl. Physiol.* — 2007. — Vol. 102. — P. 87-93.
67. **Wang Q., Paulson O.B., Lassen.** Effect of NO blockade by L-NAME on cerebral blood flow response to changes in carbon dioxide tension // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 1992. — Vol. 12. — P. 947-952.

68. **Welsh D.G., Segal S.S.** Endothelial and smooth muscle cells conduction in arterioles controlling blood flow // *Am. J. Physiol.* — 1998. — Vol. 274. — H178-H186.

69. **Williams W.G., Jones D.L., Colton C.D.** Endothelin ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors raise vasoconstriction in human-resistant vessels // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1991. — Vol. 180. — P. 475-480.

70. **Wu C.** Heat shock Transcription factors: structure and regulation // *Annual review of cell and developmental biology.* — 1995. — Vol. 11. — P. 441-469.

71. **Yergey J.A., Heyes M.P.** Brain eicosanoid formation following acute penetration injury as studies by in vivo micro-

dialysis // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2002. — Vol. 38. — P. 137-145.

72. **You J.M., Golding E.M., Bryan R.M.** Arachidonic acid metabolites, hydrogen peroxide, and EDHF in cerebral arteries // *Am. J. Physiol.* — 2005. — Vol. 289. — H1077-H1083.

72a. **Lis B., Snipes J.A., Simandle S.A., Busija D.W.** Acetaminophen-sensitive prostaglandin production in cerebral endothelial cells // *Am. J. Physiol.* — 2005. — Vol. 288. — R897-R902.

Поступила 08.06.11

Б.И. Кузник

## **Свертываемость и фибринолитическая активность лимфы при различных патологических состояниях (обзор собственных данных и данных литературы)**

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования  
«Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, 672090, Чита, ул. Горького, 39а

*В обзоре приведены сведения, полученные автором и его сотрудниками, а также данные литературы о свёртывании лимфы при кровопотере, судорожном синдроме, травме, краш-синдроме, ожогах, инъекциях тромбина и гепарина, экспериментальной тромбозе и других патологических состояниях. Показано, что свёртывание лимфы при развитии патологических состояний в тканях может опережать сдвиги, наблюдаемые в крови. Приводятся данные, свидетельствующие о том, что в лимфе при повреждении тканей растворение фибриновых сгустков происходит значительно быстрее, чем в крови.*

**Ключевые слова:** кровь, лимфа, тканевая жидкость, свёртывание, фибринолиз

B.I. Kuznik

## **Coagulation and fibrinolytic activity of lymph in various pathological conditions (review of own and literature data)**

Chita State Medical Academy, 39a, Gorky str., Chita, 672090, Russia

*The review presents information by the author and his collaborators, as well as literature data on the coagulation of lymph in blood loss, convulsive syndrome, trauma, crush syndrome, burns, injections of thrombin and heparin, an experimental thrombosis and other pathological conditions. It is shown that the coagulation of lymph in the development of pathological conditions in tissues may outpace changes observed in the blood. We present evidence that dissolution of fibrin clots in the lymph tissue if damaged, is many times faster than in the blood.*

**Key words:** blood, lymph, tissue fluid, coagulation, fibrinolysis

В последние годы появился целый ряд сообщений, свидетельствующих о том, что важную роль в разделении кровеносного и лимфатического русла принадлежит тромбоцитам. Оказалось, что тромбоциты являются основными скрытыми регуляторами развития лимфатической сети, ибо с их помощью в эмбриональном периоде происходит разделение кровеносных и лимфатических сосудов [41, 43, 56, 57]. Уменьшение числа или нарушение агрегации тромбоцитов ведет к появлению нетипичных лимфо-венозных соединений и сопровождается попаданием крови в лимфатические сосуды [56]. Тромбоциты агрегируют в местах соединения кардинальной вены и лимфатических мешков, таким образом «запечатывая» лимфатические сосуды со стороны вены.

Активация и агрегация тромбоцитов начинается со связывания O-гликозилированного мукопротеина подопланина, экспрессированного на эндотелиальных

клетках лимфатических сосудов (LECs), но отсутствующего на эндотелии артерий и вен, с лектин-подобным рецептором C-типа 2 (Clec-2) кровяных пластинок, в результате чего запускается внутриклеточный сигнальный каскад, опосредованный тирозинкиназой (Syk), Slp76 и PLC- $\gamma$ 2, приводящий в конечном итоге к формированию кровяного сгустка, изолирующего вену от лимфатического мешка, что разобщает кровеносную и лимфатическую системы. Когда взаимодействие компонентов этого пути разрывается, наступает абберрация связей между кровеносными и лимфатическими сосудами, в результате чего происходит смешивание крови и лимфы. У эмбрионов, в случае отсутствия тромбоцитов разделение кровеносных и лимфатических сосудов не происходит [56, 57], т.е. кровяные пластинки служат посредниками в формировании лимфатической системы.

Многочисленными исследованиями установлено, что свёртывание лимфы, взятой из различных бассейнов, осуществляется более медленно, а фибринолиз более интенсивно, чем в крови [10, 12, 16, 17, 26, 42,

**Для корреспонденции:** Кузник Борис Ильич, д-р мед. наук, проф. каф. нормальной физиологии ФГБОУ ВПО «ЧГМА» Минздрва РФ. E-mail: bi\_kuznik@mail.ru

48, 50, 53]. Особый интерес представляют исследования по изучению коагуляционной и фибринолитической активности лимфы при различных экспериментальных патологических состояниях.

### Острая кровопотеря

Еще в 1963 г. было показано [9], что при 20% острой кровопотере на протяжении 1 ч свертывание лимфы не меняется, в то время, как через 1—5 мин после кровопускания наблюдается выраженная гиперкоагуляция крови, обусловленная повышением тромбопластической активности. На основании этих опытов автор пришел к единственно правильному выводу, что тромбопластические агенты при кровопотере поступают в кровь из сосудистой стенки [21, 22]. В дальнейшем с помощью предложенной нами и нашими сотрудниками методики [3, 4] было доказано, что при кровопотере гуморально изолированные общая сонная артерия и яремная вена выделяют в общий кровоток прокоагулянт, напоминающий по своим свойствам тканевой фактор (ТФ), ранее обозначаемый как тромбопластин, и тканевой активатор плазминогена — t-РА [3, 4, 16, 19].

У собак после 20—30% кровопотери уже через 5 мин резко сокращается время свертывания крови и рекальцификации плазмы, что обусловлено повышением тромбопластической активности. Этот эффект сохраняется на протяжении 60 мин (срок исследования). В условиях кровопотери более чем в 2 раза возрастает толерантность плазмы к гепарину, тогда как протромбиновое и тромбиновое время, а также общая антитромбиновая активность существенно не меняются. Вместе с тем, у таких собак возрастала фибринолитическая активность крови, что, в основном, связано с поступлением в циркуляцию активатора плазминогена. Иное отмечалось со стороны свертывающей и фибринолитической активности лимфы. Через 5 и 30 мин после кровопотери время свертывания и рекальцификации, толерантность к гепарину, тромбопластическая активность лимфы, тромбиновое и протромбиновое время, концентрация фибриногена и фибринолитическая активность лимфы не изменялась. В то же время у таких животных возрастала активность фибриназы в лимфе, что, безусловно, свидетельствовало о ее сгущении [3, 4, 14, 15, 36].

При 50% кровопотере уже через 1 мин время свертывания крови сокращалось в 2,5 раза и резко уменьшалось время рекальцификации плазмы, что было обусловлено повышением тромбопластической активности. Выраженная гиперкоагуляция крови сохранялась на протяжении часа и не имела тенденции к нормализации. Толерантность плазмы к гепарину после 50% кровопотери в отдельных опытах повышалась в 2 раза. После кровопускания уменьшалась об-

щая антитромбиновая активность и в плазме нередко появлялся тромбин (FIIa) — отдельных опытах наступало свертывание цитратной крови, в которой были связаны ионы  $Ca^{2+}$ . Уже через 1 мин после кровопотери падало содержание фибриногена, и его концентрация в крови продолжала снижаться на протяжении всего срока наблюдения (60 мин). Этот эффект связан с развитием ДВС-синдрома, о чем свидетельствует наличие не только продуктов паракоагуляции, но и образование эритроцитарных и фибриновых эмболов в циркуляции. В пользу данного заключения говорит и падение концентрации отдельных факторов свертывания крови, в том числе фибриногена и протромбина. Фибринолитическая же активность крови повышалась уже на 1 мин и сохранялась на протяжении 1 ч, что является защитной реакцией, направленной на лизис образовавшихся в кровотоке фибриновых сгустков.

После 50% кровопотери сокращение времени свертывания и рекальцификации через 1 мин наблюдалось и в лимфе, однако этот эффект был слабее, чем в крови. Чем больше времени проходило после кровопотери, тем сильнее была выражена гиперкоагуляция в лимфе. Одновременно в лимфе слегка повышалась концентрация отдельных факторов свертывания, в том числе фибриногена (напомним, что в крови его содержание падало), что свидетельствует о сгущении лимфы. Фибринолитическая активность лимфы на протяжении 1 ч после 50% кровопотери не изменялась [3, 4].

Эксперименты с кровопотерей позволили прийти к выводу, что сдвиги в свертывании крови после кровопотери далеко не всегда сопровождаются изменениями лимфокоагуляции. Ускорение свертываемости лимфы наступает лишь при очень интенсивной кровопотере. По-видимому, сохранение жидкого состояния лимфы даже при выраженной гиперкоагуляции, сопровождающейся коагулопатией потребления, чрезвычайно целесообразно. Известно, что тканевая жидкость непосредственно контактирует с клеткой и ее свертывание может привести к быстрой гибели клетки. Сохранение тканевой жидкости и лимфы в жидком состоянии даже при интенсивном внутрисосудистом свертывании крови позволяет поддерживать жизнеспособность клеток различных внутренних органов и тем самым сохранить жизнь.

### Инъекции адреналина

При инъекции адреналина собакам уже через 5—10 мин резко ускоряется свертываемость крови и стимулируется фибринолиз. Свертывание же лимфы, время ее рекальцификации, фибринолитическая и антитромбиновая активность, а также концентрация различных факторов свертывания (V, VII, X, XIII, фиб-

риногена) на протяжении срока наблюдения не меняется [32, 33, 35, 48]. Аналогичной направленности сдвиги в свертывании и фибринолитической активности крови и лимфы наблюдались после инъекции ацетилхолина, нитроглицерина, питуитрина, холинхлората, а также после острой гипоксии. Несмотря на то, что во всех указанных экспериментах на протяжении 1 ч наблюдалось ускорение свертывания крови, повышение утилизации протромбина, увеличение толерантности плазмы к гепарину, падение антитромбиновой активности и усиление фибринолитической активности крови, эти показатели в лимфе не претерпевали существенных изменений [21, 22, 24, 30, 31, 47, 50]. Ускорение свертывания крови и усиление её фибринолитической активности в рассматриваемых ситуациях связано с появлением факторов (в первую очередь везикул из эндотелия сосудов), экспрессирующих ТФ, и с выделением t-РА. Однако, обладая относительно большой молекулярной массой (тканевой фактор состоит из 263 аминокислотных остатков и находится чаще всего на осколках клеточных мембран, t-РА имеет молекулярную массу 70 кД), они не проходят через стенку капилляров в тканевую жидкость и, следовательно, в лимфу [10, 16, 20].

Иные результаты получены в опытах с внутривенным введением гистамина. В этих экспериментах уже через 5 мин наблюдалось сокращение времени свертывания крови, рекальцификации плазмы и повышение толерантности плазмы к гепарину. Явление гиперкоагуляции сохранялось на протяжении всего срока исследования (в течение 1 ч), практически не ослабевая. Протромбиновое время при этом не изменялось, тогда как концентрация фибриногена падала, что свидетельствовало о его потреблении в процессе внутрисосудистого свертывания крови. Фибринолиз активировался сразу же после введения гистамина и сохранялся повышенным в течение 1 ч.

В большинстве опытов скорость свертывания лимфы, концентрация плазменных факторов и её фибринолитическая активность не изменялись. Вместе с тем, у собак после инъекций гистамина сокращалось тромбиновое время лимфы, и в ней уменьшалась концентрация соединений, способных нейтрализовать тромбин. Эти опыты позволяют думать, что в лимфе после введения гистамина происходило образование тромбина, связывающего естественные антикоагулянты, благодаря чему их концентрация уменьшалась [16, 18, 24].

Ю.М. Левин [26—28, 50] показал, что через 30—60 мин после введения никотиновой кислоты время свертывания крови и рекальцификации плазмы и лимфы удлиняются, тогда как толерантность плазмы и лимфы к гепарину повышалась, а протромбиновое время сокращалось. Следует, однако, отметить,

что в наших экспериментах, проведенных на собаках, через 1—5 мин после внутривенного введения никотиновой кислоты наблюдалось ускорение свертывания крови и усиление её фибринолитической активности [16, 24]. По всей видимости, в опытах Ю.М. Левина имелась вторичная гипокоагуляция, о чем свидетельствует резкое падение концентрации фибриногена как в крови, так и в лимфе.

Во всех перечисленных экспериментах воздействия производились или непосредственно на кровь, или на вегетативную нервную систему. Для доказательства роли клеточных структур различных тканей в регуляции свертываемости лимфы и крови необходимо было провести такие эксперименты, в эфферентное звено которых были бы вовлечены целые органы. И в качестве такого воздействия был выбран стрихнин, приводящий к развитию судорожных сокращений мышц.

### Введение стрихнина

С использованием стрихнина проведены 2 серии наблюдений. В первой из них вводились малые дозы препарата (0,1 мл 0,01% раствора/кг массы), не вызывающие явных судорог. Вместе с тем, в этих опытах наступало явное повышение возбудимости двигательных центров, ибо любой шум приводил к вздрагиванию, а иногда к судорожным подергиваниям. Во второй серии экспериментов стрихнин вводили до наступления выраженного судорожного приступа. При этом доза стрихнина увеличивалась в 2—3 раза. Как показали эксперименты, при введении малых доз стрихнина, не вызывающих судорог, на протяжении 1 ч отмечалось незначительное ускорение свертывания крови на фоне отсутствия сдвигов со стороны активности плазменных факторов коагуляции и фибринолитической активности. В лимфе при этом каких-либо сдвигов со стороны свертывания и фибринолитической активности не наблюдалось. Иное отмечалось при введении больших доз стрихнина, сопровождающихся резкими судорогами. К сожалению, во время судорожного периода брать у собак кровь и лимфу не удавалось, и все эксперименты ставились лишь после прекращения первого приступа судорог, которые на протяжении опыта повторялись неоднократно.

Оказалось, что уже через 1 мин после прекращения первого приступа судорог наступало резкое укорочение времени свертывания крови и лимфы, повышение утилизации протромбина и толерантности плазмы к гепарину. Эта реакция продолжалась в течение 1 ч (срок наблюдения). Полученные данные обусловлены повышением тромбопластической активности крови и лимфы и связаны с поступлением фрагментов клеточных мембран (микровезикуляцией) в исследуемые жидкости. Что касается крови, то вряд

ли приходится сомневаться, что это эндотелиальные слущенные клетки или их фрагменты, экспрессирующие или не экспрессирующие ТФ. В отношении лимфы такое заключение было бы явно преждевременным. По всей видимости, в лимфу поступают микрочастицы из мембраны мышечных веретён, с расположенными на ней анионными фосфолипидами. Активность большинства факторов коагуляции в крови и лимфе не изменялась, тогда как содержание фибриназы возрастало, а уровень фибриногена падал. Особенно важно отметить, что в отдельных опытах в лимфе отмечалось довольно значительное снижение концентрации фибриногена, что может быть обусловлено его потреблением в процессе внутрисосудистого свёртывания. Кроме того, в лимфе уменьшалось содержание антитромбинов. Во всех случаях и в крови и в лимфе резко возрастала фибринолитическая активность, что связано с освобождением активатора плазминогена [12, 15, 19, 24].

Полученные данные свидетельствуют о том, что параллельные сдвиги в свертывании и фибринолитической активности крови и лимфы наступают в том случае, когда раздражающий агент действует не только на сосудистую стенку, но и непосредственно или опосредованно на рабочие органы (в нашем случае мышцы). Мы не сомневаемся, что из сокращающихся мышц в тканевую жидкость также поступают прокоагулянты и стимулирующие лизис сгустка агенты, что и приводит к ускорению свертывания и фибринолитической активности интерстициальной жидкости, лимфы и крови.

### Инъекции гепарина

О том, что свертываемость крови и лимфы может изменяться параллельно, свидетельствуют опыты с однократным внутривенным введением гепарина. Оказалось, что уже через 1 мин после инъекции гепарина в дозе 200 ед./кг массы время свертываемости крови и рекальцификации плазмы удлинялось — кровь и плазма не свертывалась в пробирке на протяжении часа и более и несколько активировался фибринолиз. В лимфе через 1 и 5 мин после инъекции гепарина время свертывания и рекальцификации изменялись незначительно. Фибринолитическая активность при этом проявляла лишь слабую тенденцию к стимуляции. Через 30 и 60 мин после инъекции гепарина наступала полная инкоагулябельность лимфы и повышалась её фибринолитическая активность. Нет никакого сомнения, что гепарин, имея сравнительно небольшую молекулярную массу (до 15—20 кД), проникает через капилляры в тканевую жидкость и приводит к вторичным сдвигам в свертывании и фибринолитической активности лимфы. Однако для этого

требуется время. Вот почему в лимфе обнаруженные сдвиги проявляются с запозданием [19].

Аналогичные эксперименты были проведены на кроликах. После введения 150 ЕД гепарина на 1 кг массы тела через 30—60 мин удлинялось в 1,5—2 раза время свёртывания крови и рекальцификации плазмы, и незначительно повышалась её фибринолитическая активность. Через 1 ч после введения гепарина время свёртывания лимфы, время рекальцификации, протромбиновое и тромбиновое время также удлинялось. Через сутки после инъекции гепарина показатели свёртывания крови и лимфы практически не отличались от исходных [26].

Полученные данные на наш взгляд, имеют большое практическое значение. Инкоагулябельность лимфы после введения гепарина при наличии внутрисосудистого свёртывания крови обеспечивает жизнедеятельность клеток различных органов и таким образом способствует сохранению жизни.

Оригинальные эксперименты проведены И.Ф. Ярошенко и др. [37,38,39], изучившими пути поступления гепарина  $^{35}\text{S}$ , введенного в соединительную ткань лапы собаки. Оказалось, что резорбция гепарина началась уже через 1 мин после его введения через левый и правый лимфатические протоки и достигла максимума через 20 мин, а затем постепенно начала снижаться. При этом концентрация гепарина  $^{35}\text{S}$  в крови стала возрастать лишь после двадцатой минуты. Следует, однако, напомнить, что в условиях нормы гепарин в крови отсутствует [20, 32, 34, 44]. Синтезируется гепарин базофилами и тучными клетками. В то же время в стенке сосуда и на её поверхности содержится значительное количество гликозамингликанов и гликопротеидов, углеводные цепи которых несут гепариноподобные структуры, участвующие в активации антитромбина III (АТ-III). Можно полагать, что лимфатические сосуды также, как и кровеносные, содержат гликозамингликаны и, тем самым, способны активировать АТ-III, который в отсутствие гепарина оказывает чрезвычайно слабое антикоагулянтное действие. Если учесть, что молекулярная масса АТ-III составляет всего 58 кД [11, 51], то можно предположить, что в тканевую жидкость наряду с экзогенным гепарином после его инъекций проникает комплекс АТ-III + гепарин или активированный АТ-III. Однако для окончательного решения данного вопроса требуется проведение дополнительных исследований.

Инъекции тромбина животным вызывают двухфазные сдвиги в гемокоагуляции: вначале наступает короткая стадия гиперкоагуляции, сопровождающаяся развитием ДВС, которая сменяется длительной фазой гипокоагуляции и повышением фибринолитической активности. Последняя обусловлена не только

коагулопатией потребления, но и выбросом естественных антикоагулянтов, обладающих антитромбиновым действием, и активатора плазминогена из сосудистой стенки [23, 24], базофилов и тучных клеток [35]. Кроме того, появление в сосудистом русле тромбина приводит к образованию с различными белками, гормонами и факторами свертывания крови комплексных соединений, обладающих антикоагулянтным и «неферментативным фибринолитическим действием» [11].

Нами и нашими сотрудниками установлено, что введение малых доз тромбина (10 ед./кг массы) лишь слегка замедляет свертывание крови и уменьшает концентрацию фибриногена, не влияя на содержание естественных антикоагулянтов и фибринолитическую активность крови. В лимфе же при этом на протяжении 15 мин не наблюдается каких-либо сдвигов в свертывающей и фибринолитической активности.

Вливание тромбина из расчета 30 ед./кг массы уже через 5 мин приводит к развитию выраженной гипокоагуляции крови, повышению уровня антитромбинов, уменьшению концентрации плазменных факторов, в том числе фибриногена, а также усилению фибринолитической активности крови. Эта реакция сохраняется на протяжении 60 мин (срок наблюдения). В лимфе же при этом каких-либо сдвигов со стороны свертывания и фибринолиза не происходит [23, 24, 31].

### Краш-синдром

Известно, что синдром длительного раздавливания тканей сопровождается развитием ДВС, что нередко заканчивается смертью больного. Значительный интерес представляло изучение в этих условиях свертывающей и фибринолитической активности лимфы [25]. Опыты проводились следующим образом: мягкие ткани одной из конечностей собаки сдавливали на протяжении 4 ч грузом силой 10 кг/см<sup>2</sup>. Лимфу и кровь забирали для исследования до начала эксперимента, перед снятием и после снятия пресса. Оказалось, что длительное сдавление мягких тканей приводит к выраженному ускорению свертывания крови и рекальцификации плазмы, повышению толерантности плазмы к гепарину, уменьшению протромбинового и тромбинового времени, резкому снижению в крови концентрации антитромбинов, увеличению уровня фибриногена и торможению фибринолиза. У таких собак в ряде случаев в крови выявлялся тромбин, ибо наступало спонтанное свертывание цитратной плазмы. Эти сдвиги свидетельствуют о развитии типичного ДВС. Не вызывает сомнений, что гиперкоагуляция при Краш-синдроме обусловлена поступлением в кровяной ток продуктов разрушения тканей, так как ускорение свертывания крови наблюдалось в результате образования протромбиназы по внешнему

пути, о чем свидетельствует значительное сокращение протромбинового времени.

Особенно резкие сдвиги со стороны изучаемых показателей коагуляционного гемостаза наблюдались сразу после снятия пресса. Время свертывания крови при этом по сравнению с контролем сокращалось почти в 3 раза. Кровь на исследование с цитратом натрия практически не удавалось собрать, так как она свертывалась в пробирке. Время рекальцификации сокращалось после снятия пресса в 3,5 раза, а толерантность к гепарину возрастала более чем в 2 раза. Особенно резко уменьшалось протромбиновое время (в среднем с 16 до 9 с), что связано с прорывом тканевого тромбoplastина из поврежденных тканей в сосудистое русло, а также наличием «свободного» тромбина. Концентрация фибриногена после снятия пресса по сравнению с контролем увеличивалась более чем в 2 раза. Этот эффект может быть связан с выбросом фибриногена из депо (печени), а также резким увеличением его синтеза под влиянием провоспалительных цитокинов. Почти в 2 раза у таких собак падала антитромбиновая активность, и в 4 раза удлинялось время растворения фибринового сгустка. Последнее обусловлено наличием в поврежденных тканях ингибиторов фибринолиза, действие которых, в естественных условиях преобладает над влиянием активаторов [25].

Сдвиги в лимфе у собак перед снятием пресса были менее выражены. У них лишь уменьшалось тромбиновое время, падала антитромбиновая активность и снижалась концентрация фибриногена.

После снятия пресса отмечалась тенденция к сокращению времени свертывания лимфы, тогда как время её рекальцификации явно уменьшалось. У таких животных сокращалось протромбиновое и тромбиновое время, падала концентрация антитромбинов и содержание фибриногена, но наблюдалась явная тенденция к активации фибринолиза.

Полученные данные свидетельствуют о том, что регуляция свертывания лимфы является более совершенным процессом, чем крови. В лимфе, несмотря на громадное поступление из поврежденных тканей разрушенных клеточных структур, гиперкоагуляция была выражена относительно слабо, уровень фибриногена понижался, что, безусловно, свидетельствует о его потреблении, а фибринолиз возрастал. Следует заметить, что ни в одном случае в лимфе не обнаружен свободный тромбин, ибо спонтанное свертывание цитратной плазмы ни до снятия, ни после снятия пресса не происходило.

Сказанное, однако, не означает, что при краш-синдроме не происходило свертывание тканевой жидкости и лимфы. Об этом свидетельствует резкое уменьшение концентрации фибриногена. В то же

время в лимфе фибринолиз по сравнению с кровью осуществлялся в 23 раза (!) быстрее. При столь выраженной фибринолитической активности в лимфе происходило быстрое растворение образующихся фибриновых сгустков. Более того, вряд ли при такой активности фибринолиза могла наступить стабилизация фибриновых сгустков. Этот факт, бесспорно, свидетельствует о лучшей приспособляемости тканевой жидкости и лимфы в борьбе против тромбообразования [16, 25].

### Иммобилизация и ожог

При трехчасовой иммобилизации собаки в крови возрастал уровень ПДФ и АТ-III, тогда как в лимфе удлинялось время рекальцификации и повышалось содержание ПДФ [37, 38, 40]. При нанесении ожоговой травмы (степень II—IIIа, площадь ожога  $5,1 \pm 0,12\%$  от общей поверхности тела собаки) в доузловом сосуде подколенного лимфоузла скорость лимфотока увеличивалась в 3 раза. После ожога наступало ускорение свёртывания крови, сокращение протромбинового времени и увеличение уровня фибриногена, а также повышение концентрации антитромбинов, по-видимому, за счёт высокого содержания ПДФ. При ожоге значительное количество фибриногена поступает непосредственно из лимфы в кровотоки через посткапиллярные венулы. Свёртывание лимфы при ожоговой травме замедлялось, в ней возрастала концентрация антитромбинов, ПДФ и усиливалась фибринолитическая активность [39]. При ожоговом шоке (степень IIIб—IIIа, площадь ожога 25—30%) уже через 5—15 мин развивалась резкая гиперкоагуляция крови и лимфы, возрастало содержание фибриногена, падала активность антитромбина III, отмечалась высокая концентрация ПДФ. В крови наступала стимуляция фибринолиза, тогда как в лимфе уменьшалось содержание активатора плазминогена и плазмина.

Следует отметить, что через 3 ч после нанесения ожоговой травмы и развития шока сдвиги в коагуляции крови и лимфы были однонаправленными и свидетельствовали о развитии ДВС. На основании полученных данных И.Ф. Ярошенко [38, 40] приходит к выводу, что «при ожоговом шоке нарушения лимфо-гемокоагуляции формируются в результате взаимовлияния факторов коагуляции, поступающих из лимфы в кровь и из крови в лимфу с образованием порочного круга, и выражаются в ДВС-синдроме».

Через 15 мин после развития висцерального химического ожогового шока наблюдалась выраженная гиперкоагуляция крови и лимфы, сопровождающаяся повышением ПДФ, снижением концентрации антитромбинов и усилением фибринолитической активности. Через 3 ч после начала эксперимента гиперкоагу-

ляция в лимфе сменялась вторичной гипокоагуляцией. При этом значительно возрастало содержание ПДФ, что говорит о наличии ДВС-синдрома [40]. В лимфе, оттекающей от печени, развивалась гипокоагуляция, сопровождающаяся падением антитромбинов, в том числе А-III, уменьшением концентрации фибриногена (более чем в 2 раза), нарастанием ПДФ и торможением фибринолиза. В то же время свёртываемость кишечной лимфы ускорялась в 2,5 раза, резко уменьшалось протромбиновое и тромбиновое время, концентрация фибриногена увеличивалась, а фибринолитическая активность тормозилась почти в 3 раза. Нет никакого сомнения, что при висцеральном химическом шоке как в крови, так и в лимфе, развивался типичный ДВС-синдром [38]. Вместе с тем, если при висцеральном химическом шоке дренировать лимфатический печеночный проток и не давать лимфе поступать в кровь, то явления ДВС значительно сглаживаются, что, безусловно, связано с выведением из организма продуктов разрушения тканей, обладающих выраженной тромбопластической активностью. По мнению И.Ф. Ярошенко, такой способ борьбы с ДВС может быть использован для лечения больных с обширными поражениями внутренних органов, сопровождающимися деструктивными изменениями тканей.

При травматическом повреждении у кроликов костей и мягких тканей челюстно-лицевой области наблюдается повышение свёртываемости крови и лимфы. Через 1 ч после травмы гиперкоагуляция в большей степени выражена в крови. Через 1 сут. после травмы гиперкоагуляция усугублялась, и в обеих жидкостях появлялись РФМК и ПДФ. Вначале в течение 1-го ч после травмы наблюдалось некоторое увеличение скорости лимфотока, что является явно защитным механизмом, а затем движение лимфы замедлялось и к концу первых суток достигало 78% от исходного уровня. Вполне возможно, что последнее связано с увеличением вязкости лимфы и образованием в ней легко растворимого фибрина [1,2].

Все представленные в этом разделе данные говорят о том, что при развитии ДВС-синдрома процесс коагуляции захватывает не только кровь, но также тканевую жидкость и лимфу. Вместе с тем, в лимфе процесс коагуляции, по всей видимости, чаще всего не заканчивается появлением стабилизированного фибрина, благодаря чему создаются условия для сохранения жизнедеятельности клеток. Но существует и еще одна сторона затрагиваемой проблемы. Известно, что при самых различных сердечно-сосудистых заболеваниях, тяжело протекающих инфекциях, травмах, злокачественных новообразованиях различной локализации, тяжёлых, длительно протекающих оперативных вмешательствах развивается не только



ДВС-синдром, но и тромбозы и тромбоэмболии, вплоть до эмболии лёгочной артерии, нередко приводящей к летальному исходу. Представленные наблюдения, свидетельствуют о том, что тромбозы и тромбоэмболии, как и ДВС, не могут рассматриваться как болезни, при которых сдвиги в коагуляции затрагивают только кровь. В патогенезе этих нарушений значительная роль должна принадлежать повреждениям тканевого и лимфатического звеньев гуморального транспорта. Без учета происходящих сдвигов в тканевой жидкости и лимфе механизмы этих нарушений не могут считаться расшифрованными, а применяемая терапия может оказаться безуспешной.

Ю.М. Левин [26, 50] в эксперименте на кроликах с венозным тромбозом изучал, как изменяется свёртываемость крови и лимфы. При этом уже через 1 сут. у кроликов возникала гиперкоагуляция, сопровождающаяся резким падением уровня антитромбинов и фибринолитической активности крови и увеличением концентрации фибриногена. На 2-е сут. эти сдвиги были выражены еще сильнее. В лимфе, полученной из грудного протока, наблюдались точно такие же изменения коагуляции, как и в крови. Применение на фоне тромбоза террилитина (фибринолитик), никотиновой кислоты и гепарина совместно, не только способствовало ликвидации тромбоза, но и постепенно нормализовало процессы свёртывания и фибринолиза в крови и лимфе.

При экспериментальном тромбозе глубоких вен наступали существенные сдвиги в состоянии свёртывающей системы и фибринолитической активности крови и лимфы. При этом отмечалось сокращение времени свёртывания крови и рекальцификации плазмы, каолинового и протромбинового и времени. Эти сдвиги достигали максимума в крови к 15-м сут. после развития флеботромбоза. Интенсивность их уменьшалась к 30-м сут. от начала эксперимента. Выраженные сдвиги в свёртывающей активности лимфы проявлялись уже в 1-е сут. после развития тромбоза и достигали максимальных величин на 10—15-е сут. от начала эксперимента. Толерантности крови к гепарину, начиная с 1-х сут. после моделирования тромбоза, повышалась, и эта тенденция сохранялась, достигая максимума к 10-м и 15-м сут. течения заболевания. Толерантность лимфы к гепарину возрастала к концу 1-х сут. после моделирования тромбоза и оставалась повышенной до 10-х сут. наблюдения. Однако к 15-м сут. толерантность лимфы к гепарину возвращалась к исходным цифрам, тогда как в венозной крови подобные изменения наблюдались лишь в отдаленный период (к 25—30 сут.) наблюдения.

Таким образом, развитие гиперкоагуляции при экспериментальном тромбозе в лимфе опережало аналогичные процессы, протекающие в крови [29].

При экспериментальном флеботромбозе фибринолитическая активность крови к концу 1-х суток тормозилась, но в последующие сроки отмечалось укорочение времени лизиса фибринового сгустка. В лимфе увеличение времени лизиса сгустка наблюдалось на 1—5-е сут. эксперимента, но в дальнейшем её фибринолитическая активность возвращалась к норме. Следует отметить, что сдвиги в фибринолитической активности лимфы были выражены в значительно большей степени, чем в крови. Применение гепарина при экспериментальном флеботромбозе у собак приводило к развитию гипокоагуляции и стимуляции фибринолиза как в крови, так и в лимфе: при этом изменения в лимфе наступали значительно раньше и зачастую были выражены сильнее, чем в крови [29].

У животных с моделированием гипертензивного синдрома и недостаточности кровообращения развивается гиперкоагуляция и депрессия фибринолиза как в крови, так и в лимфе. Инъекции террилитина приводили к возникновению гипокоагуляции и усилению фибринолиза в обеих жидких средах организма [29, 50].

Экспериментальные данные, полученные на животных, с большой осторожностью следует экстраполировать на человека. И все же при анализе представленных фактов невольно напрашивается мысль, что при заболеваниях, сопровождающихся субфебрилитетом, необходимо целенаправленно стимулировать процесс лимфообращения.

У больных с лимфогеновенозным шунтированием введение гепарина или террилитина приводило к развитию выраженной гипокоагуляции лимфы. При этом гепарин в дозе 30000 ЕД в сутки вызывал более выраженное замедление свёртывания лимфы, чем террилитин. Одновременно у больных отмечалось значительное улучшение состояния больных. Особенно хорошие результаты терапии получены при совместном введении гепарина и террилитина, гепарина и никотиновой кислоты, террилитина и салицилата натрия. При всех перечисленных вариантах наряду с гипокоагуляционным эффектом отмечалось значительное усиление дренажной функции гуморального транспорта — наступало усиление лимфотока в 3—5 раз [26—28]. Следовательно, изменения в свёртывающей и фибринолитической активности крови и лимфы носит однонаправленный характер.

Как видно из представленных данных, лишь очень сильные стимулирующие или разрушающие клетки воздействия сопровождаются выраженными сдвигами не только в свёртывающей системе крови, но и в лимфе. Отсюда невольно напрашивается вывод, что прокоагулянты, выделяемые из клеток экстравазального пространства, в значительной степени утилизируются в пределах межклеточных промежутков. Фрагменты клеточных мембран, обладающих свойством частич-

ного или полного тромбобластина, являются триггером активации факторов свёртывания, находящимся в интерстиции и лимфе, благодаря чему должен образоваться фибрин непосредственно в межклеточном пространстве. Об этом, в частности, свидетельствуют наши данные [23, 24, 31], а также исследования G.J. Miller et al. [53], говорящие о том, что в лимфе резко увеличено содержание ПДФ и D-димера.

Представленные факты позволяют высказать предположение, что в механизме развития тромбозов и ДВС-синдрома немаловажную роль играет поступление прокоагулянтов из клеток в тканевую жидкость и лимфу. Между тем, известно, что сериновые протеазы, в том числе тромбин, фактор Ха, APC и другие, являются стимуляторами клеточного роста и регенерации тканей [16—18, 50]. Следовательно, появление активных факторов свёртывания крови в интерстициальном пространстве должно оказывать непосредственное влияние на функциональную активность клеток и тканей.

В настоящее время установлено, что на различных клетках имеются образования, относящиеся к так называемым протеиназактивируемым рецепторам (PAR), обладающим высоким сродством к тромбину, фактору Ха, активированному протеину С и другим сериновым протеиназам, принимающим участие в процессе свёртывания крови и фибринолизе [5—8, 33, 34, 46, 52]. Нет никакого сомнения, что в целом организме это действие осуществляется в экстравазальном пространстве через тканевую жидкость.

Хочется поднять еще один вопрос, связанный с взаимодействием свёртывающей активности тканевой жидкости, лимфы и крови — факторы, ускоряющие свёртывание лимфы в норме и особенно при таких воздействиях, как острая кровопотеря, действие гистамина, стрихнина, краш-синдроме и других патологические состояния, могут поступать в лимфу только через интерстициальную жидкость, всасывающуюся через лимфатические капилляры. Мы предполагаем, что такими структурами являются микровезикулы, происходящие из самых различных клеток, подвергшихся действию физиологических или патологических раздражителей. Правомочно ли такое заключение?

Вероятно, да. В настоящее время доказано, что различные ткани способны в процессе возбуждения «отпочковывать» микровезикулы, обладающие выраженной прокоагулянтной активностью. Но единственный путь, по которому они могут продвигаться, это тканевая жидкость и лимфа. К сожалению, наличие микровезикул в интерстиции и лимфе до последних дней не изучалось.

В то же время на основании приведенных сведений мы вправе сделать вывод, что способны свёртываться не только кровь и лимфа, но и тканевая жид-

кость, в результате чего осуществляется так называемая экстравазальная коагуляция [12, 13, 14, 55]. Более того, экстравазальное свёртывание тканевой жидкости, приводящие к появлению слоя фибрина, в условиях нормы и, тем более, при патологических состояниях должно способствовать репарации поврежденных тканей [42, 43].

В заключение мы хотим обратить внимание на следующий факт. До сих пор диссеминированное внутрисосудистое свёртывание (ДВС) рассматривается как реакция, протекающая только в крови. Наши же наблюдения [12, 13, 15] а также результаты исследований других авторов [9, 10, 37—39, 45, 49, 52, 54] показывают, что никогда эта реакция не протекает изолировано, ибо всегда в свёртываемость вовлекаются и другие жидкости (лимфа, интерстициальная жидкость) единой гуморальной транспортной системы. Вне зависимости от того, где запускается процесс, приводящий к гиперкоагуляции (клетка, интра- или экстравазальное свёртывание), при патологии нет тех или иных нарушений в системе гемостаза без сдвигов в других звеньях единого гуморального транспорта. Вот почему мы считаем, что следует отказаться от термина ДВС и заменить его термином синдром интравазальной и экстравазальной коагуляции [13—16].

Приведенные в этом обзоре сведения имеют не только теоретическое значение. Они позволяют понять, как осуществляется регуляция единой транспортной системы организма, куда входит кровь, лимфа и тканевая жидкость. Более того, они помогают нам глубже разобраться в механизмах развития тромбоэмболических заболеваний и ДВС-синдрома.

### Список литературы

1. *Алиев С.Д., Алиев Э.М.* Расстройство коагуляционного компонента гемо- и лимфостаза при травматическом повреждении челюстно-лицевой области у кроликов // Международный журнал по иммунореабилитации. — 2009. — Т. 11, №1. — С. 97-98.
2. *Алиев М.Х., Алиев О.С.* Нарушение свёртываемости крови и лимфы при экспериментальном пародонтите. Международный журнал по иммунореабилитации. 2009. — Т. 11, №1. — С. 110-111.
3. *Ворожанинская Л.Г., Завьялов А.В., Кузник Б.И.* К вопросу о выделении тканевых факторов свёртывания крови в сосудистое русло. Некоторые вопросы экспериментальной и клинической медицины. — Чита, 1964. — С. 110-115.
4. *Ворожанинская Л.Г., Завьялов А.В., Кузник Б.И.* К механизму развития гиперкоагуляции при острой кровопотере // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 1967. — №9. — С. 26-30.
5. *Горбачёва Л.Р.* Нейропротективное действие ключевых протеиназ гемостаза: Автореф. дисс. на соискание ученой степени д.м.н. — М., 2008. — 42 с.
6. *Горбачёва Л.Р., Пинелис В.Г., Струкова С.М.* Механизмы цитопротективного действия активированного

протеина С при эксайтотоксичности. Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии. — М., 2009. — С. 19.

7. **Горбачева Л.Р., Сторожевых Т.П., Пинелис В.Г., Ишивата С., Струкова С.М.** Модуляция тромбином и фактором Ха выживаемости гиппокампальных нейронов // Биохимия. — 2006. — 71(10). — С. 1338-1346.

8. **Горбачева Л.Р., Сторожевых Т.П., Пинелис В.Г., Струкова С.М.** Активированный протеин С защищает нейроны мозга от глутаматной эксайтотоксичности // Матер. III Всеросс. науч. конф. «Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии» (с международным участием), Москва (1–3 февраля), 2007. — С. 57-58.

9. **Зубаиров Д.М.** О стабильности агента, вызывающего гиперкоагуляцию, после острой кровопотери // Вопросы мед. химии. — 1963. — №6. — С. 621-626.

10. **Зубаиров Д.А., Андрушко И.А., Кузнецов В.И.** и др. О циркуляции тканевого тромбопластина в кровотоке // Физиол. ж. СССР. — 1984. — №6. — С. 814-817.

11. **Кудряшов Б.А.** Биохимические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. — М., 1975. — 488 с.

12. **Кузник Б.И.** Свертываемость лимфы и тканевой жидкости // Основы общеклинической лимфологии и эндозологии. — М., 2003. — С. 92-107.

13. **Кузник Б.И.** ТГС, ДВС или гипер-гипокоагуляционный синдром // Проблемы клинич. медицины. — 2009. — №2. — С. 74-91.

14. **Кузник Б.И.** Взаимосвязи иммунитета и гемостаза в эксперименте и клинике // Четвёртая Всероссийская конференция «Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии». — М., 2009. — С. 267-269.

15. **Кузник Б.И.** Нетрадиционные представления о механизмах развития тромбгеморрагического синдрома и диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови // Тромбоз, гемостаз и реология. — 2010. — №1. — С. 22-43.

16. **Кузник Б.И.** Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. — Чита: Экспресс-издательство, 2010. — 828 с.

17. **Кузник Б.И., Будажабон Г.Б., Цыбиков Н.Н.** Сравнительная характеристика свертывающей и фибринолитической активности крови и лимфы // Физиол. журнал СССР. — 1976. — №6. — С. 867-872.

18. **Кузник Б.И., Василев Н.В., Цыбиков Н.Н.** Иммуногенез, гемостаз и неспецифическая резистентность организма. — М.: Медицина, 1989. — 312 с.

19. **Кузник Б.И., Витковский Ю.А., Маложик Л.П.** и др. Кровь, лимфа, тканевая жидкость, клетка — основные компоненты ДВС-синдрома // Матер. междунар. симпозиума «Молекулярные механизмы регуляции функции клетки». — Тюмень, 2005. — С. 246-249.

20. **Кузник Б.И., Максимова О.Г.** Общая гематология. Гематология детского возраста. — Ростов-на-Дону: Феникс, 2007. — 575 с.

21. **Кузник Б.И., Мищенко В.П.** К механизму развития адреналиновой гиперкоагуляции // Фармакол. и токсикол. — 1967. — №4. — С. 463.

22. **Кузник Б.И., Мищенко В.П.** Влияние адреналина на свертывание крови и лимфы // Бюлл. эксперим. биол. — 1971. — №11. — С. 13.

23. **Кузник Б.И., Мищенко В.П., Будажабон Г.Б., Цыбиков Н.Н.** Действие внутривенных вливаний тромбина и гетерогенной крови на свертываемость лимфы // Физиол. журнал СССР. — 1976. — №10. — С. 460-463.

24. **Кузник Б.И., Скипетров В.П.** Форменные элементы крови, сосудистая стенка, гемостаз и тромбоз. — М.: Медицина, 1974. — 320 с.

25. **Курбатова З.А.** К механизму изменений свертываемости крови при синдроме длительного раздавливания: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — Иркутск, 1974.

26. **Левин Ю.М.** Основы лечебной лимфологии. — М.: Медицина, 1986. — 288 с.

27. **Левин Ю.М.** Основы общеклинической лимфологии и эндозологии. — М., 2003. — 465 с.

28. **Левин Ю.М.** Новый уровень лечения и оздоровления. — М., 2008. — 298 с.

29. **Матюшин А.В.** Нарушения системы гемостаза и перекисного окисления липидов крови и лимфы при экспериментальном флеботромбозе: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — Саранск, 2004. — 22 с.

30. **Мищенко В.П.** Влияние холинхлората на свертываемость крови и лимфы // Фармак. и токсик. — 1972. — №1. — С. 92-96.

31. **Мищенко В.П.** Сосудистая стенка как эфферентный регулятор процесса свертывания крови и фибринолиза: Автореф. дисс. на соискание ученой степени д.м.н. — Новосибирск, 1973. — 40 с.

32. **Мищенко В.П., Мищенко И.В.** Физиология системы гемостаза. — Полтава, 2003. — 124 с.

33. **Струкова С.М.** Тромбин — регулятор воспаления и репарации тканей // Биохимия. — 2001. — Т. 66. — С. 14-27.

34. **Струкова С.М., Ткачук В.А.** Протеиназы системы свертывания крови и фибринолиза как клеточные регуляторы // Биохимия. — 2002. — №1. — С. 3-4.

35. **Тищенко Е.Г., Турашев А.Д., Максименко А.В.** Регуляторные эффекты взаимодействия гликозамингликанов углеводной выстилки люминальной сосудистой поверхности с низко- и высокомолекулярными лигандами // Кардиол. Вестник. — 2007. — №2. — С. 68-71.

36. **Цыбиков Н.Н.** Свертываемость крови и лимфы при гетеротрансфузионном шоке у собак // Пробл. гемат. и перелив. крови. — 1976. — №12. — С. 33-36.

37. **Шойхет Я.Н., Момот А.П.** О роли и взаимосвязи гемостатических и воспалительных реакций в формировании очагов гнойной деструкции органов и тканей // Проблемы клинической медицины. — 2008. — №4. — С. 102-117.

38. **Ярошенко И.Ф.** Коагулирующая активность лимфы из грудного лимфатического протока и других лимфатических коллекторов // Гематол. трансфузиол. — 1985. — №9. — С. 27-29.

39. **Ярошенко И.Ф.** Роль лимфатической системы в процессе лимфокоагуляции: Автореф. дисс. на соискание ученой степени д.м.н. — М., 1987. — 32 с.

40. **Ярошенко И.Ф., Курочкин В.И.** Нарушение свертывающей активности афферентной и эфферентной лимфы подколенного лимфатического узла при ожоговой травме у собак // Патол. Физиол. и эксперим. Терап. — 1984. — №4. — С. 17-21.

41. **Bertozzi C.C., Hess P.R., Kahn M.L.** Platelets: Covert regulators of lymphatic development // Arterioscler. Thrombosis and Vascf. Biol. — 2010. — Vol. 30, №12. — P. 2368-2371.

42. **Blomstrand R., Nilsson J.M., Dahlback O.** Coagulation studies on human thoracic duct Lymph // Scand. J. Clin. Lab Invest. — 1963. — Vol. 56. — P. 248-250.

43. **Carrabolino L., Fuentes J.** Platelets play an essential role in separating the blood and lymphatic vasculatures during embryonic angiogenesis // Circ. Res. — 2010. — №7. — P. 197-201.

44. **Dvorak H.F.** Angiogenesis // J. of Thrombosis et Haemost. — 2005. — №8. — P. 1835-1842.

45. *Falanga A., Marchetti M., Vignoli A.* Pathogenesis of thrombosis in cancer // *Thrombosis and cancer.* — London and New-York: MN Martin Dunitz, 2004. — P. 11-29.
46. *Hanley C.A., Johnston M.G., Nelson W.* Coagulation of sheep intestinal and preformal lymph // *Lymphology.* — 1988. — Vol. 21. — P. 110-115.
47. *Hoffman M., Colina C.M., McDonald A.G.* et al. Tissue factor around dermal vessels has bound factor VII in the absence of injury // *J. Thromb. Haemost.* — 2007. — Vol. 5, №7. — P. 1403-1407.
48. *Kuznik B.I., Tsybikov N.N.* Immune Mechanisms Regulating the Hemostasis System // *Hematol. Rev.* — 1992. — Vol. 3, Part 2. — P. 3-20.
49. *Kuznik B.I., Tsybikov N.N.* Cytokines, Immunoglobulins and Hemostasis // *Hematol. Rev.* — 1996. — Vol. 7. — Part 2. — P. 43-70.
50. *Le D.T., Borgs P., Toneff T.W.* et al. Hemostatic factors in rabbit limb lymph: relationship to mechanisms regulating extravascular coagulation // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 1998. — Vol. 274, №3. — P. 769-776.
51. *Levin G.* New Lymphology and endoecology — new medicine. — M., 2011. — 230 p.
52. *Lugassy G., Falanga A., Kakkar A.K., Rickles F.R.* *Thrombosis and cancer.* — London and New York: Martin Dunitz, 2004. — 230 p.
53. *Mebta D., Malik A.B.* Signaling mechanisms regulating endothelial permeability // *Physiol. Rev.* — 2006. — №1. — P. 279-367.
54. *Miller G.J., Howarth D.J., Atfield J.C.* et al. Haemostatic Factors in Human Peripheral Afferent Lymph // *Thrombosis and Haemostasis.* — 2000. — Vol. 83, №3. — P. 427-432.
55. *Ohtani O., Ohtani Y., Caroti C.J.* et al. Fluid and cellular pathways of rat lymph nodes in relation to lymphatic labyrinths and Aquaporin-1 expression // *Arch. Histol. Cytol.* — 2003. — Vol. 66, №3. — P. 261-272.
56. *Suzuki-Inoue K., Inoue O., Osaki J.* Novel platelet activation receptor CLEC-2: from discovery prospects // *J. Thromb. Haemost.* — 2011. — Vol. 9. — Suppl. 1. — P. 44-55.
57. *Uhrin P., Zaujec J.M., Olcayda D.* et al. Novel function for blood platelets and podoplanin in developmental separation of blood and lymphatic circulation // *Blood.* — 2010. — №19. — P. 3997-4005.

Поступила 24.01.2012

Н.Г. Никифоров<sup>1,2,4</sup>, А.Н. Грачев<sup>1,2</sup>, И.А. Собенин<sup>2</sup>, А.Н. Орехов<sup>2,3</sup>, Ю.Г. Кжышковска<sup>1,2</sup>

## **Взаимодействие нативных и модифицированных липопротеидов низкой плотности с клетками интимы при атеросклерозе**

<sup>1</sup> Медицинский факультет Маннгейм Университета Рупрехта-Карла Гейдельберга, Маннгейм, Германия

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

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

<sup>4</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

*Обзор посвящен основным клеточным и молекулярным процессам, приводящим к образованию и накоплению пенистых клеток: повышенной трансмиграции моноцитов в субэндотелиальное пространство в местах воспаления, активации макрофагов, модификации липопротеидов, различным типам поглощения атерогенно модифицированных, ассоциированных и нативных липопротеидов, а так же участию различных молекулярных систем в обратном транспорте холестерина в макрофагах. Особое внимание уделено последним данным по участию сквенджер-рецепторов, как в процессах поглощения модифицированных липопротеидов, так и в обратном транспорте холестерина. Обсуждаются наиболее актуальные и нерешенные вопросы в области механизмов функциональных взаимодействий между макрофагами и липопротеидами: каковы способы распознавания, поглощения и внутриклеточного процессирования ассоциированных ЛПНП и как ассоциированные ЛПНП влияют на функциональное программирование макрофагов.*

**Ключевые слова:** атеросклероз, липопротеид, эндоцитоз, фагоцитоз, сквенджер-рецептор, моноцит, макрофаг, воспаление

N.G. Nikiforov<sup>1,2,4</sup>, A.N. Gratchev<sup>1,2</sup>, I.A. Sobenin<sup>2</sup>, A.N. Orekhov<sup>2,3</sup>, Yu.G. Kzhyhskowska<sup>1,2</sup>

## **Interaction of native and modified low density lipoprotein with intimal cells in atherosclerotic lesion**

<sup>1</sup> Medical Faculty Mannheim, Ruprecht-Karls University of Heidelberg,

Mannheim, Germany, Theodor-Kutzer Ufer 1-3, 68167 Mannheim, Germany

<sup>2</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

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

<sup>4</sup> Russian Cardiology Research Center, 15a, 3rd Cherepkovskaya str., Moscow, 121552, Russia

*In the present review we focus on the major cellular and molecular processes leading to the formation and accumulation of foamy cells: increased transmigration of monocytes into sub-endothelial sites of inflammation, activation of macrophages, modifications of lipoproteins, different types of uptake of native and associated lipoproteins (endocytosis, phagocytosis, and less-investigated — patocytosis), as well as participation of different molecular systems in the reverse cholesterol transport in macrophages. Special attention is given to the recent data indicating that scavenger receptors participate not only in the uptake of modified lipoproteins, but also in the reverse cholesterol transport. In conclusion, we discuss most relevant open questions in our understanding of the mechanism and functional consequences of macrophage/lipoprotein interactions: which receptor systems are used for the recognition and internalisation of aggregated lipoproteins, what are the mechanisms of intracellular processing of associated lipoproteins, and how associated lipoproteins affect functional programming of macrophages.*

**Key words:** atherosclerosis, lipoprotein, endocytosis, phagocytosis, scavenger receptor, monocyte, macrophage, inflammation

### Возникновение атеросклеротического поражения

Липопротеиды плазмы и клетки интимы, включая макрофаги, играют ключевую роль в развитии атеросклеротического поражения. Взаимодействие последних с атерогенномодифицированными липопротеидами приводит к формированию пенистых клеток [4]. В обзоре обсуждаются основные этапы и механизмы взаимодействия липопротеидов и макрофагов.

Липопротеиды низкой плотности (ЛПНП) преодолевают эндотелиальный слой и проникают в интиму, где накапливаются, в случае, если они были подвергнуты атерогенным модификациям. Модифицированные ЛПНП проявляют также провоспалительный эффект [5]. В участках изменений воспалительного характера повышается локальная концентрация таких цитокинов, как Monocyte chemoattractant protein-1 (моноцитарный хемотактический белок 1, MCP-1/CCL2) (рис. 1). MCP-1/CCL2 является основным цитокином, привлекающим моноциты в воспаленные участки различных тканей и органов [20, 37]. На поверхности эндотелия, покрывающего очаг клеточной реакции, начинает экспрессироваться vascular cell adhesion molecule 1 (молекула межклеточной адгезии 1, VCAM-1) и другие молекулы клеточной адгезии [23]. Моноциты привлекаются в места повышенной концентрации MCP-1 при помощи рецептора к MCP-1/CCR2, распознают VCAM-1 и прикрепляются к поверхности воспаленного эндотелия (рис. 1).

Связывание моноцитов с эндотелием происходит также в результате взаимодействия Р-селектин гликопротеин лиганда 1 (PSGL-1) с эндотелиальными селектинами [51]. Моноциты в результате оказываются прочно прикрепленными к эндотелиальным клеткам из-за взаимодействия интегринов моноцитов с лигандами эндотелиальных клеток. Иммуногистохимические исследования пораженной артерии человека позволяют предположить, что интегрины моноцитов VLA-4 и LFA-1 и соответствующие им лиганды эндотелиальных клеток, VCAM-1 и ICAM-1, могут играть важную роль в процессах раннего атерогенеза [53, 63]. Стоит отметить, что агрегация тромбоцитов на эндотелии пораженных участков может вызывать также взаимодействие моноцитов и эндотелия посредством активации NF- $\kappa$ B сигналинга и экспрессии адгезионных молекул [51].

В настоящее время все больше экспериментальных подтверждений находит теория, согласно которой, циркулирующие в крови моноциты гетерогенны по способности к миграции в очаг воспаления и дальнейшей амплификации воспалительных реакций. Однако до сих пор является спорным вопрос, какие маркеры моноцитов характеризуют их провоспалительные свойства [31]. Часть исследователей склонна считать, что наиболее интенсивно трансмигрируют в ответ на воспалительные стимулы моноциты, экспрессирующие CD16, которые по разным данным могут составлять до 20% от общего числа моноцитов крови [3, 6, 7, 33].

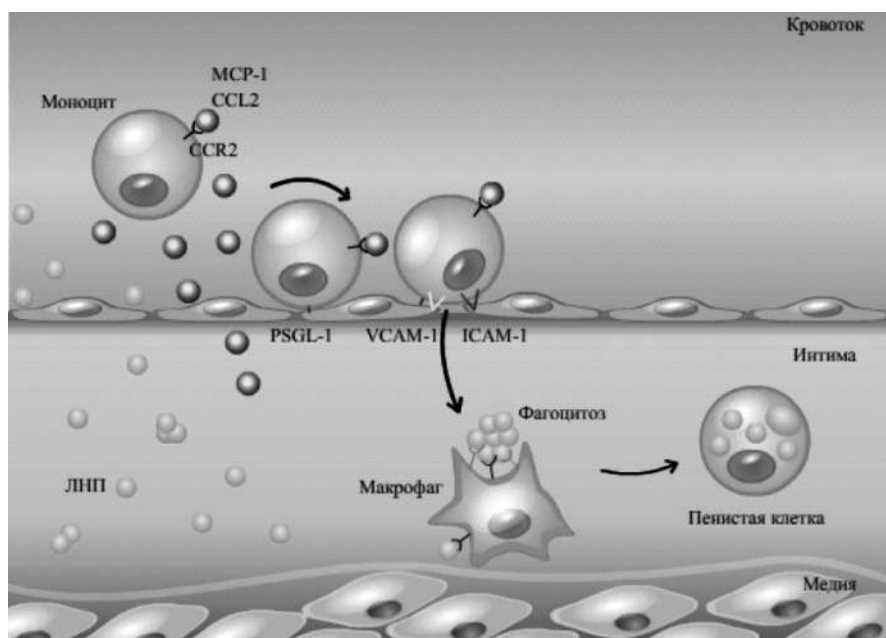


Рис. 1. Миграция моноцитов в интиму. ЛПНП, проникая в интиму, связываются с протеогликанами. Модификации также способствуют ассоциации липопротеидов, что ведет к их накоплению в клетках. Эти процессы вызывают ответ, характеризующийся секрецией хемокинов (MCP-1/CCL2) и изменениями в экспрессии молекул клеточной адгезии. Повышенная экспрессия VCAM-1 способствует адгезии моноцитов в области поражения.

Наше недавнее исследование совместно с коллегами из университета Йены (Германия) показало, что у больных с семейной экспрессией стабиллина-1 на CD14+CD16+ моноцитах ассоциирована с про-атеросклеротическим программированием этих клеток. Так, повышенная адгезия к активированным эндотелиальным клеткам была обнаружена у CD14(+)CD16(+) моноцитов, экспрессирующих повышенное количество CD68, stabilin-1 и CD11 [54].

После адгезии моноциты транс-мигрируют в субэндотелиальные слои по градиенту MCP-1. Воспалительные сигналы приводят к накоплению моноцитов в интиме, где они дифференцируются в макрофаги и поглощают модифицированные липопротеиды, формируя пенные клетки [46] (рис. 1). По мере развития атеросклеротического поражения, гладкомышечные клетки и Т-клетки также проникают в интиму, и захват ЛПНП усиливается. Уязвимые бляшки характеризуются увеличением количества апоптотических клеток, образованием фагоцитозной трещины (эффероцитоз), что в результате приводит к образованию липофильного некротического ядра. Уменьшение внешнего фиброзного слоя уменьшает стабильность поражения, что делает его подверженным разрыву и образованию тромбов [21, 34, 53, 62].

### Активация макрофагов

Макрофаги играют важную роль в развитии атеросклероза. При помощи эндоцитоза и фагоцитоза макрофаги поглощают ассоциированные модифицированные ЛПНП (ас-ЛПНП), фагоцитируют апоптотические клетки и секретируют широкий спектр факторов, регулирующих воспаление и фиброз. В частности, макрофаги вырабатывают компоненты внеклеточного матрикса (ВКМ) и могут способствовать деградации ВКМ посредством выработки матричных металлопротеиназ и их ингибиторов. Эти функции макрофагов зависят от характера активации последних, которая, в свою очередь, регулируется цитокинами, ростовыми факторами и гормонами из микроокружения. Наиболее распространенной является концепция, описывающая два основных типа активации макрофагов: M1 и M2 [26, 28, 76], зависящие от цитокинов, производимых Т-хелперами 1 и 2 типов соответственно. Активация 1-го типа (M1) или классическая активация является ответом на провоспалительные стимулы, такие как интерферон-гамма (ИФН-гамма) или липополисахарид (ЛПС). Для M1 характерна секреция активных форм кислорода (АФК) и провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли альфа (ФНО-альфа) и интерлейкин (ИЛ) -1, -6, -12, а также экспрессией Fc-гамма рецепторов 1, 2, 3. Второй тип (M2) или альтернативная активация макрофагов — результат

влияния противовоспалительных цитокинов, таких, как ИЛ-4, -10, -13 и трансформирующий фактор роста бета или других противовоспалительных медиаторов, например глюкокортикоидов [9, 27, 29]. Результатом альтернативной активации макрофагов является экспрессия противовоспалительных цитокинов — антагонист рецептора ИЛ-1, ИЛ-10, CCL18 и экспрессия таких маркеров как рецептор гаптоглобина CD163, маннозный рецептор (CD206) и стабиллин-1 [29, 32, 44]. Нашей лабораторией ранее было показано [30], что глюкокортикоиды имеют специфическое и отличное от других факторов альтернативной активации влияние на функцию макрофагов. Так, синтез внеклеточного матрикса стимулируется ИЛ-4, но ингибируется глюкокортикоидом дексаметазоном, а секреция хемокинов ассоциированных с фенотипом M2 активированная ИЛ-4 модулируется дексаметазоном разнонаправлено [36]. В то же время процессы эндоцитоза и фагоцитоза активно стимулируются именно дексаметазоном, но не цитокинами. Одним из механизмов усиления дексаметазоном эндоцитоза и фагоцитоза является стимуляция поверхностной экспрессии сквенджер-рецепторов (scavenger receptors, SR) — основного класса рецепторов отвечающих за поглощение модифицированных липопротеидов, апоптотических телец и других эндогенных молекул, молекулярных комплексов и частиц [36, 39, 41-43]. Нами было изучено влияние атерогенных факторов крови больных атеросклерозом на способность моноцитов реагировать на сигналы, направляющие их дифференцировку. Для этого моноциты, выделенные из крови здоровых доноров, культивировались в присутствии сыворотки крови пациентов с атеросклерозом или здоровых доноров, а так же, в присутствии стимуляторов: ИФН-гамма для активации M1 или ИЛ-4 — для M2. Исследовалась зависимость продукции типичных для M1 (ФНО-альфа) и M2 (CCL18) цитокинов от условий культивирования. Было показано, что наличие в среде сыворотки крови пациентов с атеросклерозом вызывает усиление продукции как ФНО-альфа, так и CCL18 [31, 55].

Существует еще несколько цитокинов, выделяемых моноцитами/макрофагами во время атерогенеза, на которые следует обратить внимание [64]. СС-хемокин CCL2 продуцируется различными типами клеток в ответ на стимуляцию цитокинами и окислительный стресс [22]. При атерогенезе моноциты и макрофаги являются основным источником CCL2 [80], который регулирует их миграцию в интиму [79] (рис. 1). Обнаружение экспрессии рецептора СС-хемокинов CCR5 в артериальных и венозных гладкомышечных тканях [67], а также повышение экспрессии mPНК CCR5 в атеросклеротических поражениях на поздних стадиях их развития [1, 59], позволило

предположить участие лигандов CCR5 в атерогенезе. Лигандами CCR5 являются СС-хемокины CCL3, CCL4 и CCL5. Различные исследования указывают на то, что CCL3 и CCL5 участвуют в атерогенезе. Так CCL5, выделяемый тромбоцитами, способен накапливаться на поверхности моноцитов и вызывать повышенную экспрессию адгезионных молекул эндотелиальными клетками. Роль CCL3 в атерогенезе менее очевидна, однако имеющиеся данные указывают на то, что он участвует в развитии атеромы и проникновении клеток в бляшки [64]. Кроме СС-хемокинов важную роль в атерогенезе играет Serpin E1 (или PAI-1), являющийся основным ингибитором активаторов плазминогена тканевого (tPA) и урокиназного (uPA) типов. Эти две молекулы превращают неактивный плазминоген в плазмин [18, 25]. Концентрация Serpin E1 в плазме и тканях очень низка в нормальных условиях, однако при возникновении патологических процессов его концентрация возрастает [15, 18, 50].

Выделение различными типами клеток, в том числе макрофагами, Serpin E1 может являться следствием ответа на провоспалительные цитокины ФНО-альфа, ИЛ-1 или АФК [18]. Помимо тромбообразования, Serpin E1 участвует в проникновении макрофагов в сосудистую стенку. Было показано, что нейтрализация tPA молекулами Serpin E1 увеличивает связывание ингибитора комплекса интегрин-протеазы с рецептором LRP1 (low-density lipoprotein receptor-related protein, связанный с ЛПНП-рецептором белок 1), тем самым препятствуя адгезии провоспалительных макрофагов [14].

### Структура ЛПНП

Лipoproteиды — это структуры, состоящие из белков и фосфолипидов, которые осуществляют транспорт липидов в крови. ЛПНП — это класс липопротеидов с плотностью в интервале 1,019-1,063 г/мл и диаметром 20-25 нм [5]. Частицы ЛПНП состоят из гидрофобного ядра, в котором находятся триглицериды и эфиры холестерина (1600 молекул). Ядро окружает гидрофильная оболочка из фосфолипидов (700 молекул), свободного холестерина (600 молекул) и белков, в основном АпоВ-100 белок (1 молекула), который является лигандом для мембранных рецепторов [45]. ЛПНП могут подвергаться модификациям: при взаимодействии с компонентами внеклеточного матрикса, под влиянием различных протеаз, свободных радикалов, тромбина [60, 68]. Существуют различные химические и структурные процессы, которые приводят к различным типам модификаций частиц ЛПНП.

Существует несколько гипотез, согласно которым, модифицированные ЛПНП играют ключевую роль в

развитии атеросклероза [5, 45, 61]. В частности, гипотеза, согласно которой, окисленные ЛПНП являются основным фактором формирования пенных клеток, в последнее время являлась наиболее распространенной, хотя и имела некоторые противоречия [65, 69, 75, 78]. Влияние агрегации ЛПНП изучено в меньшей степени и имеет много белых пятен из-за различий в методиках исследования, используемых в разных лабораториях. Далее приведен список модификаций ЛПНП и соответствующих им рецепторов известных на сегодняшний день.

1. Нативные ЛПНП — в исследованиях *in vitro* это частицы, которые выделены из крови доноров и не подвергались никаким модификациям. Нативные ЛПНП попадают в клетку посредством ЛПНП-рецептора, рецептора липопротеидов очень низкой плотности (KGJYG) и LRP1 [61];

2. Агрегированные ЛПНП (аг-ЛПНП) — частицы, которые подверглись агрегации. Согласно некоторым исследованиям, агрегация ЛПНП не обратима и, по сути, является слиянием частиц. Согласно J.C. Khoo и с соавторами (1992), аг-ЛПНП распознаются ЛПНП-рецептором и LRP1, аналогично нативным ЛПНП. Альтернативные пути проникновения аг-ЛПНП или ас-ЛПНП в клетку не изучены [56];

3. Окисленные ЛПНП. В исследованиях *in vitro* к этому классу относят ЛПНП, которые в результате окисления, не распознаются ЛПНП-рецептором, но распознаются сквенджер-рецепторами LOX1, CD36, сквенджер-рецептором А (SR-A), stabilin-1 [16, 17, 45, 52];

4. Минимально модифицированные ЛПНП (мм-ЛПНП) — это ЛПНП, которые подверглись окислению, но распознаются ЛПНП-рецептором [52];

5. Ацетилированные ЛПНП (ацЛПНП) — искусственные аналоги окисленных ЛПНП, не существуют в природе. Рецепторы, отвечающие за захват ацЛПНП: CD36, SR-A, Stabilin-1 [39, 41, 44];

6. Циркулирующие множественно-модифицированные ЛПНП (цм-ЛПНП). В.В. Тертовым с соавторами были исследованы ЛПНП, выделенные из крови больных атеросклерозом [74]. В этом исследовании была обнаружена подфракция ЛПНП, способная вызывать накопление липидов и, в первую очередь, эфиров холестерина в гладкомышечных клетках непораженной интимы аорты человека [71]. Такие ЛПНП характеризовались пониженным содержанием сиаловой кислоты, меньшим диаметром частиц, повышенной плотностью, низкой скоростью дегградации и способностью к спонтанной агрегации [58, 70—74]. Такие ЛПНП были названы цм-ЛПНП.



## Поглощение ЛПНП

Процесс поглощения внеклеточных молекул, в том числе ЛПНП, макрофагами называется эндоцитозом. Наиболее распространенной формой эндоцитоза, используемой для поглощения ЛПНП является клатрин-зависимый рецептор-опосредованный эндоцитоз. В процессе эндоцитоза молекулы ЛПНП распознаются рецепторами на поверхности макрофагов. Процесс распознавания ЛПНП производится внеклеточными доменами рецепторов и индуцирует модификации их внутриклеточных доменов, приводящих к формированию адапторных комплексов, инвагинации плазматической мембраны, формированию клатринового слоя на внутриклеточной поверхности мембраны и в итоге образованию покрытой клатрином везикулы. Покрытые клатрином везикулы, содержащие комплекс рецептора и ЛПНП, транспортируются в сортировочный эндосомальный компартмент для дальнейшего транспорта в лизосомы, где ЛПНП должен быть расщеплен при помощи лизосомальных ферментов (рис. 2А) [12, 13, 77]. Однако чрезмерная перегрузка макрофагов ЛПНП приводит к тому, что макрофаги не справляются с деградацией ЛПНП, а внутриклеточное накопление ЛПНП является критическим фактором образования пенистой клетки. В настоящее время вопрос о том, какой внутриклеточный механизм отказывает первым и что является узким местом в этом процессе, не решен. Нами интенсивно разрабатывается несколько гипотез, в том числе недоста-

ток скавенджер рецепторов, неспособность цитоскелета к динамичным перестройкам в ответ на повышение интенсивности эндоцитоза, а так же недостаточное количество лизосомальных ферментов.

Если частицы ас-ЛПНП своими размерами превышают несколько десятков нанометров, захват ЛПНП может происходить посредством фагоцитоза. Во время фагоцитоза большие частицы ЛПНП могут связываться с несколькими рецепторами (рис. 1). Образование фагосом происходит посредством образования псевдоподий, при котором необходимыми процессами являются как локальная реорганизация субмембранного актинового цитоскелета, так и активное привлечение микротрубочек (рис. 2Б) [10, 40, 49].

Существуют отдельные наблюдения, указывающие на третий тип поглощения ЛПНП макрофагами [38]. При исследовании свойств аг-ЛПНП было обнаружено, что процесс захвата аг-ЛПНП макрофагами происходит атипично. При помощи электронной микроскопии были визуализированы цепочки аг-ЛПНП, которые находились в так называемых соединенных между собой мембранных компартментах. Данный процесс был назван патоцитозом (рис. 2В). В этой экспериментальной модели макрофаги были получены из моноцитов, при помощи инкубации в культуре в течение 2 недель. Аг-ЛПНП добавлялись в концентрации 100 мкг/мл, время инкубации с аг-ЛПНП 1 сут. Следует отметить, что данный процесс не был подробно изучен, и нет подтверждений тому, что он имеет место *in vivo*.

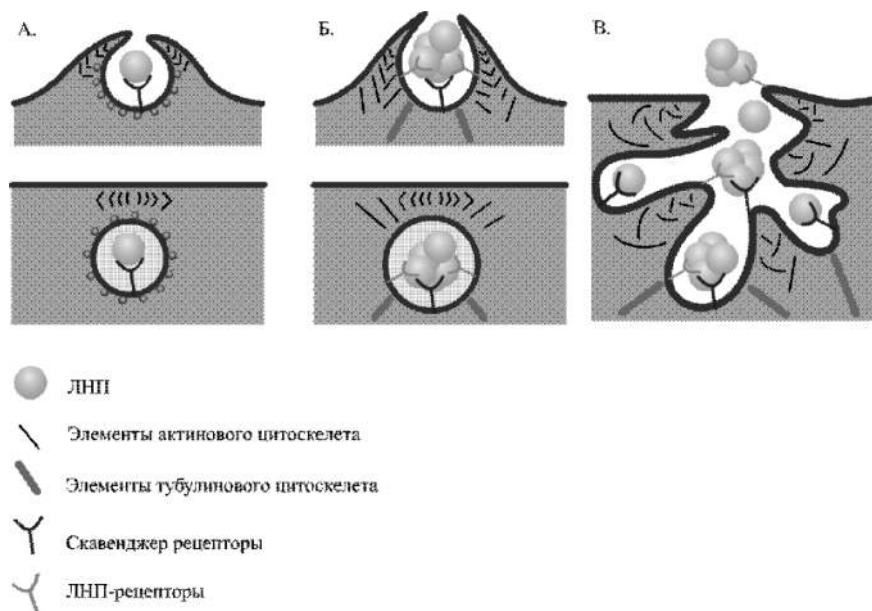


Рис. 2. Визуализация процесса поглощения аг-ЛПНП макрофагом:

А — одиночные молекулы модифицированных ЛПНП или маленькие агрегаты (<math><0,1 \mu\text{m}</math>), связавшись со скавенджер рецептором, захватываются в везикулу (размер везикул около 0,4 мкм), покрытую клатрином; Б — крупные агрегаты (>0,1 мкм) связываются с группой рецепторов и захватываются в фагосомы (размер фагосом около 1,4 мкм) [38]; В — агрегированные ЛПНП вследствие патоцитоза оказываются в соединенных между собой мембранных компартментах.

### Отток холестерина

Начальным этапом процесса обратного транспорта холестерина в печень для утилизации, является процесс оттока холестерина из клетки. Нарушения в этом процессе вместе с высоким уровнем захвата ЛПНП могут привести к формированию пенных клеток. Одним из ключевых этапов оттока является перенос холестерина на специфичные внеклеточные акцепторы, такие, как липопротеиды высокой плотности (ЛВП) и составляющие его аполипопротеины (A-I, A-II, E, J, и A-IV) [12, 13].

Важную роль в процессе оттока холестерина играют также ABC-транспортёры (АТФ-связывающий кассетный транспортёр). В основном это два транспортёра ABCA1 и ABCG1. ABCA1 — это трансмембранный белок, состоящий из 2261 аминокислот, массой 240 кДа, который использует энергию АТФ для транспорта различных субстратов через клеточную мембрану [57]. Также макрофагами экспрессируется ABCG1 [24]. Этот транспортёр осуществляет отток внутриклеточного холестерина и фосфолипидов из макрофагов в молекулы ЛВП [24, 36].

Роль скавенджер рецепторов в формировании пенных клеток определяется не только их участием в процессе захвата модифицированных ЛПНП, но также и их ролью в процессе оттока холестерина [41]. Скавенджер рецептор B1 (SR-BI) связывается с широким спектром аполипопротеинов и частиц липопротеидов и усиливает транспорт холестерина по градиенту концентрации по направлению к фосфолипид-содержащим акцепторам [12, 13, 35, 66]. В гепатоцитах (SR-BI) отвечает за поглощение холестерина, а в периферических клетках, включая макрофаги, он может быть посредником в процессе оттока холестерина. В разных типах клеток, в том числе и в макрофагах, скорость оттока холестерина, осуществляемого ЛВП или плазмой, коррелирует с уровнем экспрессии SR-BI. При этом экспрессия мРНК SR-BI была показана в утолщенной интиме аорты апоЕ-нокаутных мышей с атеросклерозом [35].

Роль SR-BI и ABC-транспортёров в формировании пенных клеток по-прежнему нуждается в изучении с использованием различных моделей атеросклероза *in vivo*. У больных семейной гиперхолестеринемией часто наблюдается низкий уровень холестерина в ЛВП, что, в свою очередь, может быть связано с нарушениями в процессе обратного транспорта холестерина. Большие частицы ЛВП2, выделенные из крови больных семейной гиперхолестеринемией, проявляют пониженную способность к оттоку свободного холестерина независимо от того, участвуют в этом процессе рецепторы SR-BI, или транспортёры ABCG1 [8]. Кроме того, была обнаружена обратная зависимость между SR-BI-зависимым оттоком холе-

стерина в частицы ЛВП2 и толщиной интимы-медии [8]. Однако, для ответа на вопрос, вызвано ли это нарушением активности SR-BI или нет, необходимо проведение экспериментальных исследований.

Так же как и SR-BI, скавенджер рецептор CD36 способен связываться с ЛВП и переносить эфиры холестерина как внутрь клетки, так и во внеклеточное пространство. Исследование геномных aberrаций показало, что область хромосомы 7q, содержащая ген *CD36*, связана с компонентами метаболического синдрома, включая ЛВП [2]. Более того, была выявлена строгая взаимосвязь между полиморфизмами единичных нуклеотидов в гене *CD36* и уровнем холестерина в ЛВП [48]. Популяционное исследование влияния пятнадцати полиморфизмов единичных нуклеотидов в гене *CD36* на экспрессию моноцитами CD36 и на уровень ЛВП позволило выявить, что 4 из 15 проанализированных полиморфизмов (rs1761667, rs3211909, rs3211913, rs3211938) влияют на экспрессию CD36, причем уровень CD36 коррелировал с уровнем ЛПОНП, но обратно коррелировал с уровнем ЛВП [48]. Эти данные позволяют предположить, что варианты последовательности гена, уменьшающие экспрессию CD36 в моноцитах, способствуют активации защитных метаболических реакций.

Роль CD36 в транспорте холестерина была исследована также на *CD36<sup>-/-</sup>* мышах [81]. У *CD36<sup>-/-</sup>* мышей наблюдалось усиление оттока холестерина и фосфолипидов, хотя уровень накопления холестерина был снижен. Такая роль CD36 может быть связана с системой ABC-транспортёров посредством как внутриклеточного сигналинга, так и транспорта [11]. Суммируя данные, полученные в популяционных исследованиях и на мышинных моделях, можно сделать вывод, что CD36 своим участием в процессе оттока холестерина может способствовать развитию атеросклероза.

### Заключение

Механизмы накопления холестерина и образования пенных клеток до конца не изучены. В последнее время гипотеза о том, что окисленные ЛПНП играют ключевую роль в развитии атеросклероза, имела наибольшую популярность, однако, получить какие-либо результаты по использованию антиоксидантов в качестве лечения сердечно-сосудистых заболеваний не удалось [52]. Изучение ас-ЛПНП, в свою очередь, пользовалось меньшей популярностью, и результаты, получаемые разными исследователями, неоднозначны. Во многом это происходит из-за различий в методиках агрегации ЛПНП в лабораторных условиях. Многие исследователи используют интенсивное взбалтывание ЛПНП, полученных из крови здоровых доноров [19, 38, 47]. Такие условия эксперимента пока еще очень далеки от ситуации имеющей место в организме. Ис-

пользование ЛПНП, выделенных из крови больных атеросклерозом, в состав которых входит подфракция цм-ЛПНП, а также инициация спонтанной агрегации таких ЛПНП в условиях 37°C в течение 4–6 ч позволяют максимально приблизить экспериментальную модель для изучения клеточных механизмов развития атеросклероза к ситуации *in vivo*.

Каковы способы поверхностного связывания ассоциированных ЛПНП? Каков путь их захвата и накопления, а также характер активации макрофагов в ответ на присутствие ассоциированных ЛПНП? Ответы на эти вопросы намного приблизят нас к пониманию развития атеросклероза и предотвращению многих сердечно-сосудистых заболеваний.

Работа была поддержана Министерством образования и науки РФ и Федеральным Министерством образования и науки Германии, проект RUS 10/B05.

### Список литературы

1. **Ali Z.A., Bursill C.A., Douglas G., McNeill E., Papaspyridonos M., Tatham A.L., Bendall J.K., Akhtar A.M., Alp N.J., Greaves D.R., Channon K.M.** CCR2-mediated antiinflammatory effects of endothelial tetrahydrobiopterin inhibit vascular injury-induced accelerated atherosclerosis // *Circulation*. — 2008. — Vol. 118(14 Suppl). — S71-77.
2. **An P., Freedman B.I., Hanis C.L., Chen Y.D., Weider A.B., Schork N.J., Boerwinkle E., Province M.A., Hsiung C.A., Wu X., Quertermous T., Rao D.C.** Genome-wide linkage scans for fasting glucose, insulin, and insulin resistance in the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Blood Pressure Program: evidence of linkages to chromosome 7q36 and 19q13 from meta-analysis // *Diabetes*. — 2005. — Vol. 54(3). — P. 909-914.
3. **Ancuta P., Liu K.Y., Misra V., Wacleche V.S., Gosse-lin A., Zhou X., Gabuzda D.** Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16- monocyte subsets // *BMC Genomics*. — 2009. — Vol. 10. — P. 403.
4. **Badimon L., Storey R.F., Vilahur G.** Update on lipids, inflammation and atherothrombosis // *Thromb. Haemost.* — 2011. — Vol. 1. — S34-42.
5. **Badimon L., Vilahur G., Padro T.** Lipoproteins, Platelets, and Atherothrombosis // *Rev. Esp. Cardiol.* — 2009. — Vol. 62(10). — P. 1161-1178.
6. **Barisone C., Garibaldi S., Ghigliotti G., Fabbì P., Altieri P., Casale M.C., Spallarossa P., Bertero G., Balbi M., Corsiglia L., Brunelli C.** CD14CD16 monocyte subset levels in heart failure patients // *Dis. Markers*. — 2010. — Vol. 28(2). — P. 115-124.
7. **Baumgartner I., Scheiner O., Holzinger C., Boltz-Nitulescu G., Klech H., Lassmann H., Rumpold H., Forster O., Kraft D.** Expression of the VEP13 antigen (CD16) on native human alveolar macrophages and cultured blood monocytes // *Immunobiology*. — 1988. — Vol. 177(3). — P. 317-326.
8. **Bellanger N., Orsoni A., Julia Z., Fournier N., Frisdal E., Duchene E., Bruckert E., Carrie A., Bonnefont-Rousselot D., Pirault J., Saint-Charles F., Chapman M.J., Lesnik P., Le Goff W., Guerin M.** Atheroprotective reverse cholesterol transport pathway is defective in familial hypercholesterolemia // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2011. — Vol. 31(7). — P. 1675-1681.
9. **Brocheriou I., Maouchea S., Duranda H., Braunersreuther V., Naourb G., Gratchev A., Koskasa F., Mach F., Kzhyshkowska J., Ninio E.** Antagonistic regulation of macrophage phenotype by M-CSF and GM-CSF: Implications in atherosclerosis // *Atherosclerosis*. — 2011. — Vol. 214. — P. 316-324.
10. **Brown M.S., Goldstein J.L.** Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1979. — Vol. 76. — P. 3330-3337.
11. **Bujold K., Rhainds D., Jossart C., Febbraio M., Marleau S., Ong H.** CD36-mediated cholesterol efflux is associated with PPARgamma activation via a MAPK-dependent COX-2 pathway in macrophages // *Cardiovasc. Res.* — 2009. — Vol. 83(3). — P. 457-464.
12. **Burke B., Lewis C.E.** *The Macrophage*, Second Edition. — Oxford: б.н., 2002. — ed. Oxford University Press.
13. **Burke B., Lewis C.E.** *The macrophage*, second edition. — Oxford University Press, 2002.
14. **Cao C., Lawrence D.A., Li Y., Von Arnim C.A., Herz J., Su E.J., Makarova A., Hyman B.T., Strickland D.K., Zhang L.** Endocytic receptor LRP together with tPA and PAI-1 coordinates Mac-1-dependent macrophage migration // *EMBO J.* — 2006. — Vol. 25. — P. 1860-1870.
15. **Cesari M., Pahor M., Incalzi R.A.** Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): a key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions // *Cardiovasc. Ther.* — 2010. — Vol. 28(5). — P. 72-91.
16. **Chang M.K., Bergmark C., Laurila A., Horkko S., Han K.H., Friedman P., Dennis E.A., Witztum J.L.** Monoclonal antibodies against oxidized low-density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages: evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophage recognition // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1999. — Vol. 96(11). — P. 6353-6358.
17. **Chen M., Masaki T., Sawamura T.** LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis // *Pharmacol. Ther.* — 2002. — Vol. 95(1). — P. 89-100.
18. **Church M.W., Gramling, Frank C.** Plasminogen Activator Inhibitor-1 is an Aggregate Response Factor with Pleiotropic Effects on Cell Signaling in Vascular Disease and the Tumor Microenvironment // *Thromb. Res.* — 2010. — Vol. 125. — P. 377-381.
19. **Costales P., Aledo R., Vernia S., Das A., Shah V.H., Casado M., Badimon L., Llorente-Cortes V.** Selective role of sterol regulatory element binding protein isoforms in aggregated LDL-induced vascular low density lipoprotein receptor-related protein-1 expression // *Atherosclerosis*. — 2010. — Vol. 213(2). — P. 458-468.
20. **Deshmane S.L., Kremlev S., Amini S., Sawaya B.E.** Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview // *J. Interferon Cytokine Res.* — 2009. — Vol. 29(6). — P. 313-326.
21. **Drager L.F., Polotsky V.Y., Lorenzi-Filho G.** Obstructive sleep apnea: an emerging risk factor for atherosclerosis // *Chest*. — 2011. — Vol. 140(2). — P. 534-542.
22. **Fantuzzi L., Spadaro F., Vallanti G., Canini I., Ramoni C., Vicenzi E., Belardelli F., Poli G., Gessani S.** Endogenous CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) modulates human immunodeficiency virus type-1 replication and affects cytoskeleton organization in human monocyte-derived macrophages // *Blood*. — 2003. — Vol. 102(7). — P. 2334-2337.
23. **Galkina E., Ley K.** Leukocyte influx in atherosclerosis // *Curr. Drug Targets*. — 2007. — Vol. 8(12). — P. 1239-1248.
24. **Gelissen I.C., Harris M., Rye K.A., Quinn C., Brown A.J., Kockx M., Cartland S., Packianathan M., Kritcharides L., Jessup W.** ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2006. — Vol. 26(3). — P. 534-540.

25. **Ghosh A.K., Vaughan D.E.** PAI-1 in tissue fibrosis // *J. Cell. Physiol.* — 2012. — Vol. 227(2). — P. 493-507.
26. **Goerd S., Politz O., Schledzewski K., Birk R., Gratchev A., Guillot P., Hakiy N., Klemke C.D., Dippel E., Kodelja V., Orfanos C.E.** Alternative versus classical activation of macrophages // *Pathobiology.* — 1999. — Vol. 67(5-6). — P. 222-226.
27. **Gordon S., Martinez F.O.** Alternative activation of macrophages: mechanism and functions // *Immunity.* — 2010. — Vol. 32(5). — P. 593-604.
28. **Gordon S., Taylor P.R.** Monocyte and macrophage heterogeneity // *Nat. Rev. Immunol.* — 2005. — Vol. 5(12). — P. 953-964.
29. **Gratchev A., Guillot P., Hakiy N., Politz O., Orfanos E., Schledzewski K., Goerd S.** Alternatively Activated Macrophages Differentially Express Fibronectin and Its Splice Variants and the Extracellular Matrix Protein b1G-H3. 2001: б.н. // *Scand. J. Immunol.* — 2001. — Vol. 53. — P. 386-392.
30. **Gratchev A., Kzhyskowska J., Utikal J., Goerd S.** Interleukin-4 and dexamethasone counterregulate extracellular matrix remodelling and phagocytosis in type-2 macrophages // *Scand. J. Immunol.* — 2005. — Vol. 61(1). — P. 10-17.
31. **Gratchev A., Sobenin I., Orekhov A., Kzhyskowska J.** Monocytes as a diagnostic marker of cardiovascular diseases // *Immunobiology.* — 2012. — Vol. 217. — P. 476-482.
32. **Gratchev A., Kzhyskowska J., Kothe K., Muller-Moliniet I., Kannookadan S., Utikal J., Goerd S.** M1 and M2 can be re-polarized by Th2 or Th1 cytokines, respectively, and respond to exogenous danger signals // *Immunobiology.* — 2006. — Vol. 211. — P. 473-486.
33. **Grip O., Bredberg A., Lindgren S., Henriksson G.** Increased subpopulations of CD16(+) and CD56(+) blood monocytes in patients with active Crohn's disease // *Inflamm. Bowel. Dis.* — 2007. — Vol. 13(5). — P. 566-572.
34. **Hansson.** Inflammatory mechanisms in atherosclerosis // *J. Thromb. Haemost.* — 2009. — Vol. 1. — P. 328-331.
35. **Ji Y., Jian B., Wang N., Sun Y., Moya M.L., Phillips M.C., Rothblat G.H., Swaney J.B., Tall A.R.** Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux // *J. Biol. Chem.* — 1997. — Vol. 272(34). — P. 20982-20985.
36. **Kennedy M.A., Barrera G.C., Nakamura K., Baldan A., Tarr P., Fishbein M.C., Frank J., Francone O.L., Edwards P.A.** ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation // *Cell Metab.* — 2005. — Vol. 1(2). — P. 121-131.
37. **Kolatukudy P.E., Niu J.** Inflammation, endoplasmic reticulum stress, autophagy, and the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 pathway // *Circ. Res.* — 2012. — Vol. 110(1). — P. 174-189.
38. **Kruth H.** Sequestration of aggregated low-density lipoproteins by macrophages // *Curr. Opin. Lipidol.* — 2002. — Vol. 13(5). — P. 483-488.
39. **Kzhyskowska J., Gratchev A., Brundiers H., Mami-di S., Krusell L., Goerd S.** Phosphatidylinositide 3-kinase activity is required for stabilin-1-mediated endosomal transport of acLDL // *Immunobiology.* — 2005. — Vol. 210(2-4). — P. 161-173.
40. **Kzhyskowska J., Krusell L.** Cross-talk between endocytic clearance and secretion in macrophages // *Immunobiology.* — 2009. — Vol. 214. — P. 576-593.
41. **Kzhyskowska J., Neyen C., Gordon S.** Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis // *Immunobiology.* — 2012. — Vol. 217. — P. 492-502.
42. **Kzhyskowska J., Workman G., Cardo-Vila M., Arap W., Pasqualini R., Gratchev A., Krusell L., Goerd S., Sage E.H.** Novel function of alternatively activated macrophages: stabilin-1-mediated clearance of SPARC // *J. Immunol.* — 2006. — Vol. 176(10). — P. 5825-5832.
43. **Kzhyskowska J.** Multifunctional receptor stabilin-1 in homeostasis and disease // *Scientific World Journal.* — 2010. — Vol. 10. — P. 2039-53.
44. **Kzhyskowska J., Gratchev A., Goerd S.** Stabilin-1, a homeostatic scavenger // *J. Cell. Mol. Med.* — 2006. — Vol. 10. — P. 635-649.
45. **Levitan I., Volkov S., Subbaiah P.V.** Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology // *Antioxid. Redox Signal.* — 2010. — Vol. 13(1). — P. 39-75.
46. **Ley K., Miller Y.I., Hedrick C.C.** Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2011. — Vol. 31(7). — P. 1506-1516.
47. **Llorente-Cortes V., Otero-Vignas M., Hurt-Camejo E., Martinez-Gonzalez J., Badimon L.** Human coronary smooth muscle cells internalize versican-modified LDL through LDL receptor-related protein and LDL receptors // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2002. — Vol. 22(3). — P. 387-393.
48. **Love-Gregory L., Sherva R., Sun L., Wasson J., Schappe T., Doria A., Rao D.C., Hunt S.C., Klein S., Neuman R.J., Permutt M.A., Abumrad N.A.** Variants in the CD36 gene associate with the metabolic syndrome and high-density lipoprotein cholesterol // *Hum. Mol. Genet.* — 2008. — Vol. 17(11). — P. 1695-1704.
49. **Luzio J.P., Parkinson M.D., Gray S.R., Bright N.A.** The delivery of endocytosed cargo to lysosomes // *Biochem. Soc. Trans.* — 2009. — Vol. 37. — P. 1019-1021.
50. **Ma Z., Paek D., Oh C.K.** Plasminogen activator inhibitor-1 and asthma: role in the pathogenesis and molecular regulation // *Clin. Exp. Allergy.* — 2009. — Vol. 39(8). — P. 1136-1144.
51. **Mestas J., Ley K.** Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis // *Trends Cardiovasc. Med.* 2008. — Vol. 18(6). — P. 228-232.
52. **Mitra S., Deshmukh A., Sachdeva R., Lu J., Mehta J.L.** Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy // *Am. J. Med. Sci.* — 2011. — Vol. 342(2). — P. 135-142.
53. **Moore K.J., Tabas I.** Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis // *Cell.* — 2011. — Vol. 145(3). — P. 341-355.
54. **Mosig S., Rennert K., Krause S., Kzhyskowska J., Neunubel K., Heller R., Funke H.** Different functions of monocyte subsets in familial hypercholesterolemia: potential function of CD14+ CD16+ monocytes in detoxification of oxidized LDL // *FASEB J.* — 2009. — Vol. 23(3). — P. 866-874.
55. **Mytar B., Gawlicka M., Szatanek R., Woioszyn M., Ruggiero I., Piekarska B., Zembala M.** Induction of intracellular cytokine production in human monocytes/macrophages stimulated with ligands of pattern recognition receptors // *Inflamm. Res.* — 2004. — Vol. 53(3). — P. 100-106.
56. **Oorni K., Pentikainen M.O., Ala-Korpela M., Kovanen P.T.** Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions // *J. Lipid. Res.* — 2000. — Vol. 41(11). — P. 1703-1714.
57. **Oram J.F.** HDL apolipoproteins and ABCA1: partners in the removal of excess cellular cholesterol // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2003. — Vol. 23(5). — P. 720-727.
58. **Orekhov A.N., Tertov V.V., Kudryashov S.A., Smirnov V.N.** Triggerlike stimulation of cholesterol accumulation and DNA and extracellular matrix synthesis induced by atherogenic serum or low density lipoprotein in cultured cells // *Circ. Res.* — 1990. — Vol. 66:2. — P. 311-320.
59. **Papaspyridonos M., Smith A., Burnand K.G., Taylor P., Padayachee S., Suckling K.E.** et al. Novel candidate genes in unstable areas of human atherosclerotic plaques // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2006. — Vol. 26. — P. 1837-1844.

60. **Parthasarathy S., Litvinov D., Selvarajan K., Garel-nabi M.** Lipid peroxidation and decomposition — conflicting roles in plaque vulnerability and stability // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2008. — Vol. 1781(5). — P. 221-231.
61. **Pennings M., Meurs I., Ye D., Out R., Hoekstra M., Van Berkel T.J., Van Eck M.** Regulation of cholesterol homeostasis in macrophages and consequences for atherosclerotic lesion development // *FEBS Lett.* — 2006. — Vol. 580(23). — P. 5588-5596.
62. **Rader D.J., Pure E.** Lipoproteins, macrophage function, and atherosclerosis: beyond the foam cell? // *Cell. Metab.* — 2005. — Vol. 1(4). — P. 223-230.
63. **Rautou P.E., Vion A.C., Amabile N., Chironi G., Simon A., Tedgui A., Boulanger C.M.** Microparticles, vascular function, and atherothrombosis // *Circ. Res.* — 2011. — Vol. 109(5). — P. 593-606.
64. **Reape T., Groot P.** Chemokines and atherosclerosis // *Atherosclerosis.* — 1999. — Vol. 147. — P. 213-225.
65. **Rizzo M., Kotur-Stevuljevic J., Berneis K., Spinaz G., Rini G.B., Jelic-Ivanovic Z., Spasojevic-Kalimanovska V., Vekic J.** Atherogenic dyslipidemia and oxidative stress: a new look // *Transl. Res.* — 2009. — Vol. 153(5). — P. 217-223.
66. **Rothblat G.H., de la Llera-Moya M., Atger V., Kellner-Weibel G., Williams D.L., Phillips M.C.** Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. 1999 // *J. Lipid Res.* — Vol. 40(5). — P. 781-796.
67. **Schecter A., Calderon T., Berman A., McManus C., Fallon J., Rossikhina M.** et al. Human vascular smooth muscle cells possess functional CCR5 // *J. Biol. Chem.* — 2000. — Vol. 275. — P. 5466-5471.
68. **Soran H., Durrington P.N.** Susceptibility of LDL and its subfractions to glycation // *Curr. Opin. Lipidol.* — 2011. — Vol. 22(4). — P. 254-261.
69. **Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T.E., Khoo J.C., Witztum J.L.** Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity // *N. Engl. J. Med.* — 1989. — Vol. 320(14). — P. 915-924.
70. **Tertov V.V., Orekhov A.N., Ryong L.H., Smirnov V.N.** Intracellular cholesterol accumulation is accompanied by enhanced proliferative activity of human aortic intimal cells // *Tissue Cell.* — 1988. — Vol. 20:6. — P. 849-854.
71. **Tertov V.V., Sobenin I.A., Gabbasov Z.A., Popov E.G., Jaakkola O., Solakivi T., Nikkari T., Smirnov V.N., Orekhov A.N.** Multiple-modified desialylated low density lipoproteins that cause intracellular lipid accumulation. Isolation, fractionation and characterization // *Lab. Invest.* — 1992. — Vol. 67:5. — P. 665-675.
72. **Tertov V.V., Sobenin I.A., Gabbasov Z.A., Popov E.G., Orekhov A.N.** Lipoprotein aggregation as an essential condition of intracellular lipid accumulation caused by modified low density lipoproteins // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1989. — Vol. 163:1. — P. 489-494.
73. **Tertov V.V., Sobenin I.A., Orekhov A.N.** Characterization of desialylated low-density lipoproteins which cause intracellular lipid accumulation // *Int. J. Tissue React.* — 1992. — Vol. 14:4. — P. 155-162.
74. **Tertov V.V., Sobenin I.A., Tonevitsky A.G., Orekhov A.N., Smirnov V.N.** Isolation of atherogenic modified (desialylated) low density lipoprotein from blood of atherosclerotic patients: separation from native lipoprotein by affinity chromatography // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1990. — Vol. 167:3. — P. 1122-1127.
75. **Upston J.M., Niu X., Brown A.J., Mashima R., Wang H., Senthilmohan R., Kettle A.J., Dean R.T., Stocker R.** Disease stage-dependent accumulation of lipid and protein oxidation products in human atherosclerosis // *Am. J. Pathol.* — 2002. — Vol. 160(2). — P. 701-710.
76. **Varin A., Gordon S.** Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology // *Immunobiology.* — 2009. — Vol. 214(7). — P. 630-641.
77. **Vieira O.V., Botelh R.J., Grinstein S.** Phagosome maturation: aging gracefully // *Biochem J.* — 2002. — Vol. 366. — P. 689-704.
78. **Witztum J.L., Steinberg D.** The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? // *Trends Cardiovasc. Med.* — 2001. — Vol. 11(3-4). — P. 93-102.
79. **Yamashita T., Kawashima S., Ozaki M., Namiki M., Inoue N., Hirat., K., Yokoyama M.** Propagermanium reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knock-out mice via inhibition of macrophage infiltration // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2002. — Vol. 22. — P. 969-974.
80. **Yoshimura T., Yuhki N., Moore S.K., Appella E., Lerman M.I., Leonard.** Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE // *FEBS Lett.* — 1989. — Vol. 244. — P. 487-493.
81. **Yue P., Chen Z., Nassir F., Bernal-Mizrachi C., Finck B., Azhar S., Abumrad N.A.** Enhanced hepatic apoA-I secretion and peripheral efflux of cholesterol and phospholipid in CD36 null mice // *PLoS One.* — 2010. — Vol. 5(3). — e9906.

Поступила 12.05.12

**Сведения об авторах:**

Грачев Алексей Николаевич, д-р биол. наук ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Кжышковска Юлия Георгиевна, канд. биол. наук, зав. лаб. нанопатологии с группой нанохимии ФГБУ «НИИОПП» РАМН

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

Собенин Игорь Александрович, д-р мед. наук, вед. науч. сотр. ФГБУ «НИИОПП» РАМН, НИИ атеросклероза РАЕН

© М.Ш.Кнопов, В.К. Тарантуха, 2013  
УДК 616-092:92 Горизонтов

### **Выдающийся ученый и организатор здравоохранения. К 110-летию со дня рождения академика П.Д. Горизонтова (1902—1987)**

Среди видных ученых-медиков нашей страны достойное место по праву принадлежит выдающемуся отечественному патофизиологу и радиобиологу, известному общественному деятелю, замечательному педагогу, академику АМН СССР, лауреату Ленинской и Государственной премий Петру Дмитриевичу Горизонтову. Он был человеком большого организаторского таланта и неиссякаемой энергии, неутомимая деятельность которого и исключительные человеческие качества снискали ему всеобщее уважение и признание. Плодотворная научная и практическая педагогическая работа, солидные труды в различных областях патологической физиологии сделали его имя хорошо известным широкой медицинской общественности страны и за рубежом и создали основу для дальнейшей разработки актуальных проблем медицины. Развитие патологической физиологии в нашей стране прочно связано с его именем.

П.Д. Горизонтов родился 16 сентября 1902 г. в г.Щучинске в Казахстане. В 1922 г. поступил в Омский медицинский институт, в котором после его окончания в 1927 г. начал свой трудовой путь в качестве ассистента кафедры патологической физиологии. В 1929 г. П.Д. Горизонтов был командирован в Москву, в лабораторию акад. А.А. Богомольца, которого он считал своим учителем и неоднократно подчеркивал свою признательность ему, за ту роль, которую Богомольец сыграл в становлении его как ученого.

С 1934 по 1952 г. П.Д. Горизонтов работал на кафедре патологической физиологии 1-го Московского медицинского института, последовательно занимая должности ассистента, доцента и профессора кафедры. Одновременно в течение ряда лет он являлся заместителем директора этого института по учебной работе, а в годы Великой Отечественной войны — директором филиала 1-го Московского медицинского института в Уфе. В 1939 г. он защитил докторскую диссертацию на тему «Значение головного мозга в



холестериновом обмене», в которой выдвинул и экспериментально обосновал теорию о роли нейроглии больших полушарий головного мозга в синтезе холестерина и развитии холестеринемий мозгового происхождения.

В 1950 г. П.Д. Горизонтов был приглашен в Институт биофизики Минздрава СССР, где с 1957 по 1962 гг. он был заместителем директора института по научной работе, а в 1962—1968 гг. возглавлял этот институт. Как и большинство крупных ученых, Петр Дмитриевич не был администратором в обычном смысле слова. Своей главной задачей он считал определение научной стратегии, оказание помощи ученым в работе, прилагал много усилий для создания в коллективе взискательной, но доброжелательной и спокойной обстановки. Работая в Институте биофизики, он продолжал и активную педагогическую деятельность, заведя кафедрой патологической физиологии (1952—1958 гг.) Центрального института усовершенствования врачей (ныне Российская медицинская академия последипломного образования).

В 1952 г. П.Д. Горизонтов был избран членом-корреспондентом, а в 1962 г. — академиком АМН СССР.

Перу П.Д. Горизонтова принадлежит свыше 200 научных работ, в том числе 7 монографий. Заслуживают особого упоминания такие работы, как «Вопросы патологической физиологии в трудах И.П. Павлова» (1952), «Вопросы патогенеза, экспериментальной терапии и профилактики лучевой болезни» (1960), «Роль АКТГ и кортикостероидов в патологии» (1968, совм. с Т.Н. Протасовой), «Методические основы эксперимента» (1969), «Патогенез кишечной формы острой лучевой болезни» (1971), «Закономерности неспецифической реакции кроветворных органов на действие чрезвычайных раздражителей» (1973), «Патологическая физиология экстремальных состояний» (1973, совместно с

Н.Н. Сиротининым), «Гомеостаз» (1976), «Радиация и система крови» (1979) и др. Научные труды посвящены патологической физиологии, радиобиологии и общей патологии.

Первые научные работы П.Д. Горизонтова были опубликованы в 1928 г. в сибирских медицинских журналах. Следует отметить цикл исследований, проведенных Петром Дмитриевичем в Магнитогорске в 1932—1934 гг., которые были посвящены вопросам физиологии труда рабочих на коксовых печах. Для профпатологии эти работы имели важное значение, они приведены в учебном руководстве по гигиене труда. В первые послевоенные годы П.Д. Горизонтов опубликовал ряд работ по патогенезу эклампсии и артериальной гипертензии при токсикозах беременности, в которых было показано, что повышение артериального давления может быть следствием затруднения кровообращения в виде ишемизации или венозного застоя любого органа, в том числе и плаценты.

П.Д. Горизонтов активно разрабатывал такие кардинальные проблемы теоретической патологии, как учение о болезни, этиологии и общем патогенезе, роль наследственности и конституции в возникновении болезней, соотношение специфических и неспецифических реакций организма при действии чрезвычайных раздражителей и др. В 1949 и 1952 гг. вышли в свет две его монографии, в которых он рассматривает наиболее важные вопросы патологической физиологии в свете учения И.П. Павлова.

П.Д. Горизонтов был одним из первых отечественных ученых, отметивших большое значение учения Г. Селье о стрессе для проблемы патогенеза ряда заболеваний. Петр Дмитриевич правильно оценил положительные стороны этого учения и подверг обоснованной критике недооценку автором роли нервной системы. С именем П.Д. Горизонтова связана дальнейшая разработка учения о стрессе, сформулированы новые представления об изменении системы крови в различные периоды стресс-реакции, подчеркнута значение нервных механизмов в реакции организма на стресс-факторы.

Работа П.Д. Горизонтова в области патологической физиологии оказалась весьма плодотворной прежде всего благодаря тому, что он удачно соединял в себе прогрессивную мысль ученого с талантом и энергией организатора. Наиболее полно раскрылись эти замечательные стороны личности П.Д. Горизонтова в Институте биофизики Минздрава СССР. Это был исключительно плодотворный период его научной и организаторской деятельности, он совпал со временем, когда остро стоял вопрос о необходимости скорейшей разработки проблем радиационной медицины в связи с развитием атомной промышленности. Петр Дмитриевич одним из первых начал системати-

ческую разработку актуальных проблем патологической физиологии и экспериментальной терапии радиационных поражений. В течение ряда лет он и его ученики изучали роль эндокринной системы при лучевых поражениях, проблеме патогенеза лучевой болезни, большое внимание уделялось детальному исследованию процессов кроветворения и нарушений реактивности организма при лучевых воздействиях. Были получены новые данные о состоянии процессов торможения в центральной нервной системе и сделана попытка установить зависимость между типологическими особенностями высшей нервной деятельности и исходом лучевой болезни, доказано развитие тяжелой токсемии и обоснована ее роль в развитии гематологических сдвигов, а также изучены изменения сердечно-сосудистой и эндокринной систем, кроветворения, нарушения терморегуляции и др. На основе этих данных была сформулирована концепция патогенеза лучевой болезни и обоснованы принципы ее экспериментальной терапии. Основная идея этой концепции заключалась в предположении одновременного действия нескольких патогенетических механизмов. В самом общем виде — это признание прямого повреждающего влияния на ткани ионизирующего излучения, гуморальных факторов, поступающих в кровь из пораженных тканей, и возможность возникновения дистрофических реакций, опосредованных через нервную систему. П.Д. Горизонтов обосновал различие между понятиями о радиочувствительности и радиопоражаемости, подчеркивая, что высокую чувствительность нервной системы к ионизирующему излучению, обнаруживаемую в начальных фазах патологического процесса при сублетальных и летальных дозах, нельзя рассматривать только как результат ее поражаемости. Ранние изменения в нервной системе он характеризовал, используя выражение И.П. Павлова, как «физиологическую меру против болезни». Им были обобщены материалы по механизму желудочно-кишечного синдрома при радиационных поражениях. Заслугой П.Д. Горизонтова явилась разработка основных принципов экспериментальной терапии лучевой болезни и ряд конкретных схем комплексного лечения. Работы Петра Дмитриевича и его учеников по этой проблеме нашли отражение в изданиях: «Патологическая физиология острой лучевой болезни» (1955), «Вопросы экспериментальной терапии и профилактики лучевой болезни» (1960), «Патогенез, экспериментальная профилактика и терапия лучевых поражений» (1964).

Его взгляды на значение гормонов в развитии патологических состояний были отражены в монографии «Роль АКТГ и кортикостероидов в патологии» (П.Д. Горизонтов, Т.Н. Протасова, 1968). По инициативе Петра Дмитриевича коллектив авторов при-

ступил к созданию фундаментального труда, посвященного экстремальным состояниям, в том числе вызванным ионизирующим излучением. Материалы этих исследований представлены в монографии П.Д. Горизонтова и Н.Н. Сиротина «Патологическая физиология экстремальных состояний» (1973). В 1976 г. под редакцией Петра Дмитриевича вышла оригинальная монография «Гомеостаз», в которой раскрыта сущность этого явления и значение для современных представлений о развитии патологических процессов. Основные разделы этой работы написаны самим П.Д. Горизонтовым.

Петр Дмитриевич был блестящим педагогом, отдававшим много сил и энергии подготовке научных кадров. Он был опытным организатором учебного процесса и научной работы. Его яркие, запоминающиеся лекции всегда отличались новизной и глубоким содержанием, отражающим современное развитие медицинской науки.

Исключительная добросовестность и целеустремленность, неутомимая и плодотворная научная активность, большая человеческая доброжелательность, столь характерные для Петра Дмитриевича, служили хорошим примером для молодежи и его ученики видели в нем замечательный пример для подражания. В журналах «Патологическая физиология и экспериментальная терапия» и «Наш современник» были опубликованы статьи П.Д. Горизонтова «Методические основы эксперимента», «Как делаются научные открытия», «Учитесь наблюдать (слово ученого к молодым)», адресованные молодому поколению, начи-

нающему свой путь в науке; в них выражено отношение ученого к научному творчеству. Под руководством П.Д. Горизонтова подготовлено и защищено свыше 40 кандидатских и докторских диссертаций.

Глубокие разносторонние знания и творческая энергия П.Д. Горизонтова нашли достойное применение в его общественно-научной деятельности. Он являлся ответственным редактором отдела «Патологическая физиология» 3-го издания Большой медицинской энциклопедии, в течение многих лет был членом правления Всесоюзного научного общества патофизиологов, почетным членом Всесоюзного общества рентгенологов и радиологов, членом редакционного совета журнала «Архив патологии» и др. Неоценим его вклад в работу редколлегии журнала «Патологическая физиология и экспериментальная терапия».

Заслуги Петра Дмитриевича были высоко оценены и отмечены наградами: тремя орденами Ленина, орденом Октябрьской Революции, орденами Трудового Красного Знамени, «Знак почета» и медалями.

Большой ученый и патофизиолог-новатор, талантливый организатор медицинской науки и видный общественный деятель, замечательный педагог и человек исключительно внимательный к окружающим — таким навсегда вошел в историю отечественной медицины Петр Дмитриевич Горизонтов.

Профессор **М.Ш. Кнопов**  
Доцент **В.К. Тарануха**  
ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава РФ