

**ПОЧТОВЫЙ АДРЕС:**

125315, Москва, ул. Балтийская, 8.  
Федеральное государственное  
бюджетное учреждение  
«НИИ Общей патологии и патофизиологии»  
Российской академии медицинских наук  
Редакция журнала  
«Патологическая физиология  
и экспериментальная терапия».  
Home page: www.medlit.ru  
E-mail: path.physiol@yandex.ru

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

ЛР №010215 от 29.04.97.

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

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

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

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

ISSN 0031-2991  
Патологическая физиология и  
экспериментальная терапия.  
2013. №3. 1–96.

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.*

**№3, 2013**  
**ИЮЛЬ—СЕНТЯБРЬ**

## **РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ**

**Главный редактор Б.Б. Мороз**

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

## **Редакционный совет**

Ю.В. Баякин (Москва), Ю.Ю. Бяловский (Рязань),  
В.Т. Долгих (Омск), А.М. Дыгай (Томск),  
А.Я. Евтушенко (Кемерово), Д.А. Еникеев (Уфа),  
В.П. Куликов (Барнаул), В.П. Михайлов (Ярославль),  
В.Г. Овсянников (Ростов-на-Дону), С.Н. Орлов (Москва),  
Н.Н. Петрищев (Санкт-Петербург), Л.А. Северьянова (Курск),  
С.А. Хачатрян (Ереван), 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 3. Предпосылки несиндромального подхода . . . . . 3

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Сергеева С.П., Литвицкий П.Ф., Гульяев М.М., Савин А.А., Бреславич И.Д.**  
К механизму Fas-индуцированного апоптоза нейронов в патогенезе ишемического инсульта . . . . . 15
- Шакова Ф.М., Клодт П.М., Кудрин В.С., Давыдова Т.В., Романова Г.А.**  
Защитная роль антител к глутамату при очаговом ишемическом повреждении префронтальной коры мозга крыс . . . . . 19
- Коваленко Н.Я., Мацневский Д.Д., Решетняк В.К.**  
Роль М4-подтипа холинорецепторов в ацетилхолиновой вазоконстрикции у крыс . . . . . 23
- Порядин Г.В., Богинская О.А., Обрубов С.А., Пыков М.И., Колбатова Е.С., Дубовик Л.Г.**  
Особенности состояния вегетативной нервной системы у детей с близорукостью, ассоциированной с недифференцированной дисплазией соединительной ткани . . . . . 27
- Игонкина С.И., Ветрилэ Л.А., Кукушкин М.Л.**  
Роль антител к нейромедиаторам антиноцицептивной системы в механизмах невропатической боли . . . . . 32
- Федотова Ю.О.**  
Комбинированное введение RJR-2403 с низкой дозой 17 $\beta$ -эстрадиола улучшает пространственное обучение у овариэктомизированных крыс . . . . . 37
- Гильяно Н.Я., Степанов С.И., Носкин Л.А., Архипова Е.Н., Конева Л.В.**  
Исследование роли супероксида, оксида азота и ионов металлов переменной валентности в цитотоксическом эффекте перекиси водорода и бета амилоида . . . . . 42
- Сбоев А.Ю., Долгих В.Т., Ларкин В.И.**  
Значимые факторы, влияющие на мозговое кровообращение у пациентов с опухолями головного мозга супратенториальной локализации. . . . . 47
- Сидоров А.В., Фатеев М.М.**  
Липидный спектр крови и выживаемость крыс с сердечной недостаточностью различной тяжести при введении нейрогормональных модуляторов . . . . . 51
- Бочаров Е.В., Карпова Р.В., Казеев И.В., Кучеряну В.Г., Бочарова О.А.**  
Исследование радиозащитной активности мультифитоадаптогена в эксперименте на мышах . . . . . 55
- Куликов В.П., Трегуб П.П., Беспалов А.Г., Введенский А.Ю.**  
Сравнительная эффективность гипоксии, гиперкапнии и гиперкапнической гипоксии в увеличении резистентности организма к острой гипоксии в эксперименте . . . . . 59
- Корозин В.И., Ляшев Ю.Д., Солин А.В.**  
Влияние фактора роста гепатоцитов на процессы перекисного окисления липидов при стрессе . . . . . 62

## ОБЗОРЫ

- Кайдашев И.П.**  
Активация ядерного фактора kB как молекулярной основы патогенеза метаболического синдрома . . . . . 65
- Маслов Л.Н.**  
Сигнальный механизм нейропротекторного эффекта ишемического preconditionирования мозга . . . . . 73
- Сорокин Г.В., Боровков В.Н., Еремин А.В., Орлов А.А., Сабурин И.Н.**  
Стимуляция репаративной регенерации при лечении переломов конечностей с применением новых биотехнологий . . . . . 81

## МЕТОДИКА

- Копаладзе Р.А.**  
Система оценки тяжести эпилептиформной реакции, индуцируемой ультразвуком у крыс . . . . . 87

## НЕКРОЛОГ

- Георгий Николаевич Крыжановский. . . . . 94

## CONTENTS

- Gusev E.Yu., Chereshnev V.A.**  
Systemic inflammation: theoretical and methodological approaches to description of general pathological process model. Part 3. Background for nonsyndromic approach

## ORIGINAL ARTICLES

- Sergeeva S.P., Litvickiy P.F., Gulyaev M.M., Savin A.A., Breslavich I.D.**  
To the Fas-induced neurons apoptosis mechanisms in stroke pathogenesis
- Shakova F.M., Klodt P., Kudrin V.S., Davydova T.V., Romanova G.A.**  
The saving role of glutamate antibodies with the acute ischemic damage of the rat brain prefrontal cortex
- Kovalenko N.Ya., Matsievsky D.D., Reshetnyak V.K.**  
The role of M4-subtype of cholinoreceptors in acetylcholine vasoconstriction
- Poryadin G.V., Boginskaya O.A., Obrubov S.A., Pykov M.I., Kolbatova E.S., Dubovik L.G.**  
Characteristics of the autonomic nervous system state in children with myopia associated with undifferentiated connective tissue dysplasia
- Igonkina S.I., Vetrile L.A., Kukushkin M.L.**  
The role of antibodies to neurotransmitters of antinociceptive system in mechanisms of neuropathic pain
- Fedotova Yu.O.**  
Co-administration of RJR-2403 with low dose of 17 $\beta$ -estradiol on spatial learning in ovariectomized rats
- Giliano N.Ya., Stepano S.I.v, Noskin L.A., Arkhipova E.N., Konevega L.V.**  
Assessing of the role superoxide, nitric oxide and redox metals in cytotoxic effect of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and amyloid- $\beta$ -protein
- Sboev A.Yu., Dolgih V.T., Larkin V.I.**  
Factors significant for cerebral circulation in patients with supratentorial brain tumors
- Sidorov A.V., Fateev M.M.**  
Plasma lipid spectrum and survival in rats with heart failure varied by severity under the influence of neurohormonal modulators
- Bocharov E.V., Karpova R.V., Kazeev I.V., Kucheryanu V.G., Bocharova O.A.**  
Investigation of multiphytoadaptogene anti-radiation activity in mice
- kKulikov V.P., Tregub P.P., Bespalov A.G., Vvedenskiy A.J.**  
Comparative efficacy of hypoxia, hypercapnia and hypercapnic hypoxia increases body resistance to acute hypoxia in rats
- Korozin V.I., Lyashev Yu.D., Solin A.V.**  
The influence of hepatocyte growth factor on lipid peroxidation processes in stress

## REVIEWS

- Kaidashev I.P.**  
Conception for permanent activation of nuclear factor kB as molecular basis for metabolic syndrom pathogenesis
- Maslov L.N.**  
Signaling mechanism of neuroprotective effect of ischemic preconditioning of brain
- Sorokin G.V., Borovkov V.N., Eremin A.V., Orlov A.A., Saburina I.N.**  
The stimulation of reparative regeneration in the treatment of fractures of the extremities with the use of new biotechnologies

## METHODS

- Kopaladze R.A.**  
The system of assessment of the severity of ultrasound epilepsy in rats

## OBITUARY

- G.N. Kryzhanovskiy

Е.Ю. Гусев, В.А. Черешнев

## **Системное воспаление: теоретические и методологические подходы к описанию модели общепатологического процесса. Часть 3. Предпосылки несиндромального подхода**

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. Значение модели системного воспаления заключается в создании теоретической и методологической основы решения практических задач.*

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

E.Yu. Gusev, V.A. Chereshevnev

## **Systemic inflammation: theoretical and methodological approaches to description of general pathological process model. Part 3. Background for nonsyndromic approach**

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

С теоретической и практической точки зрения, системное воспаление (СВ) является актуальной проблемой медицины, однако это понятие противоречиво и до настоящего времени не имеет общепринятого определения. В своё время И.И. Мечников говорил о возможности СВ, понимая под ним реакции фагоцитов во внутрисосудистой среде [14, 77]. Исторически термин «системная воспалительная реакция» (СВР) употреблялся применительно к системным изменениям при воспалении в клинике и экспериментах [49]. Отдельные признаки этой реакции стали включаться в шкалы оценки общего состояния. Однако СВР как клиническая дефиниция не была формализована до 1991 г.

### **Противоречия синдромального подхода**

В настоящее время СВ обычно отождествляется с синдромом системной воспалительной реакции/ответа (ССВР/SIRS). Четыре критерия синдрома СВР

(ССВР) были утверждены на согласительной конференции АССР/СССМ в Чикаго в 1991 г. При этом для диагностики синдрома необходимо проявление двух или более признаков:

- 1) температура  $\geq 38^{\circ}\text{C}$  или  $\leq 36^{\circ}\text{C}$
- 2) ЧСС  $\geq 90/\text{мин}$ ;
- 3) ЧД  $> 20/\text{мин}$  или гипервентиляция ( $\text{PaCO}_2 \leq 32$  мм рт.ст.);
- 4) лейкоциты крови  $> 12 \times 10^9/\text{мл}$  или  $< 4 \times 10^9/\text{л}$ , или  $> 10\%$  незрелых форм при наличии очага инфекции, тяжёлого некроза или травмы [29].

В других случаях СВ ассоциируют с менее конкретным понятием — СВР, под которой понимают системные изменения, связанные с воспалением. Так, в качестве признаков СВР обычно выделяют повышение в крови белков острой фазы [92], цитокинов и других медиаторов воспаления [107], стрессорных гормонов, глюкозы [56], продуктов пероксидации [111] и др.

В настоящее время ССВР рассматривают в качестве патогенетической основы септического шока, полиорганной недостаточности (ПОН), диссеминиро-

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

ванного внутрисосудистого свёртывания крови (ДВС). Очевидно, что критерии ССВР малоспецифичны для этих процессов и признаки могут проявляться даже при некоторых физиологических состояниях, например, беременности и родах, которые отдельные авторы также рассматривают с позиции ССВР [4, 20].

Возникновение ССВР определялось клинической необходимостью, прежде всего, решением проблемы прогноза и ранней диагностики септических осложнений, а основой для критериев послужили шкалы оценки общего состояния, в частности, APACHE II, включающая все 4 показателя ССВР. В рамках этой концепции сепсис определили как ССВР + очаг инфекции. Официальное определение сепсиса характеризует этиологический фактор как бактериальную, вирусную и грибковую инфекцию [19, 113]. Между тем, нет эпидемии сепсиса при острых респираторных вирусных инфекциях (типично наличие как минимум двух критериев ССВР). Невысокая специфичность критериев ССВР к критическим состояниям отчасти нейтрализуется произвольной верификацией этого синдрома за пределами реанимационных отделений [21, 110]. Менее вероятно наличие тяжёлого сепсиса (сепсис + органная дисфункция) при отсутствии «резиновых» критериев ССВР, однако статистика регистрирует и это [102]. Клиника сепсиса определяется комплексом «реанимационных» синдромов [95], а дефиниция «сепсис-синдром» является условным понятием. Скорее, можно говорить о мультисиндромах различного состава. В то же время при сепсисе отмечается корреляция тяжести состояния и числа выявленных критериев ССВР [62], что при наличии клиники критических состояний, здравого смысла и опыта врача позволяет решать клинические задачи. Относительно малоэффективно использование критериев ССВР при острых асептических процессах [9, 58], при хронических заболеваниях используются другие синдромы, отражающие те или иные признаки СВР.

Развитие критических состояний связывают, прежде всего, с микроциркуляторными расстройствами [39, 42], которые формируются комплексом процессов, такими как активация эндотелиоцитов, сладж, микротромбообразование, вазодилатация. Следствием этих процессов является децентрализация кровообращения, гиповолемия, тканевой отёк, сосудистый шок, гипоксия, ацидоз, токсикоз, дисфункция жизненно важных органов [68]. В свою очередь, эти изменения обуславливаются [31, 57, 108] эксайтотоксичностью (патологической активацией клеток эндогенными регуляторными факторами), «протеиназным взрывом», оксидантным стрессом, внутрисосудистой активацией факторов гемостаза, комплемента, калликреин-кининовой

системы и другими процессами. При этом синдромальные модели отражают клиническую значимость конкретных звеньев патогенеза и включают протоколы ведения больных. Целью синдромальной модели является решение конкретной клинической задачи на основе консенсуса ведущих специалистов. В зависимости от несовпадений взглядов специалистов и учёта конкретных условий в рамках одного синдрома могут использоваться различные критерии, классификации стадий, стандарты патогенетической терапии [104]. Структура синдрома обычно зависит от этапов онтогенеза. Так, синдром воспалительного ответа плода (FIRS) имеет критерии, отличные от ССВР. Синдром как клиническая категория видоспецифичен. Обычно в эксперименте у животного моделируется, с той или иной степенью соответствия, патогенетическое звено, лежащее в основе синдрома, но не все синдромальные атрибуты.

Напротив, типовые патологические процессы имеют общебиологическое значение и являются теоретическим фундаментом для синдромов и других клинических дефиниций [6, 9, 10, 21]. Модель общепатологического процесса должна отражать его сущность, основные варианты и закономерности развития, взаимосвязь с другими патологическими и физиологическими процессами, онтогенетические и филогенетические особенности, биологическое и общеклиническое значение, принципиальные методологические подходы к его исследованию, общие принципы патогенетической терапии, но не конкретные протоколы лечения и диагностики.

Любая синдромальная модель не тождественна по содержанию и цели общепатологическому процессу, но при отсутствии его адекватной модели «свободное пространство» занимают квази-синдромы. Они характеризуются отсутствием полноценных протоколов ведения больных, предназначены для описания не звена, но целой области патогенеза, которая включает ряд классических синдромов. Наиболее значительным, но не единственным примером «расширительно-го» синдромального подхода является концепция ССВР. При этом ССВР фрагментируется на более частные квази-синдромы, маркирующие его стадии [78, 112]:

- 1) местное действие медиаторов воспаления;
- 2) их генерализация без критериев ССВР;
- 3) ССВР «в узком смысле» (наличие критериев до развития критических осложнений);
- 4) CARS — синдром компенсаторного противовоспалительного ответа, характеризующийся доминированием противовоспалительных цитокинов и иммунодепрессией [23, 86, 87, 115];
- 5) синдром иммунного паралича (хаоса) с наличием критического состояния [80, 114].

В ряде своих публикаций [6, 21] мы анализировали эти «синдромы». Суть анализа такова: разделение по времени цитокинового провоспалительного и противовоспалительного ответа на уровне организма маловероятно, это подтверждается и независимыми исследованиями [50, 87]. Стадия «хаоса» по её описанию имеет отношение к СВ, но не раскрывает его динамику. Естественно, что все эти «синдромы» не имеют протокольных критериев. Вероятно, одной из целей этой классификации является «привязка» концепции ССВР к классическим представлениям о воспалении, а именно — доминирующей роли очага воспаления с поэтапным развитием СВР, а затем и критических осложнений. Соответственно, генерализация цитокинов из очага воспаления рассматривается как основной иницирующий механизм этих осложнений [33]. Однако нет доказательной базы о доминирующей роли данного механизма для инициации микроциркуляторных расстройств, особенно, когда очаг воспаления не выражен или отсутствует (гемотрансфузионный и анафилактический шок, краш-синдром, экспериментальный эндотоксический шок, молниеносный сепсис, массивная кровопотеря, эмболия околоплодными водами и др.).

От квази-синдромов следуют отличать относительно хорошо изученные процессы, в названии которых понятие «синдром» является общепринятым термином без связи с его реальным содержанием. Известным примером является «общий адаптационный синдром», который правильнее рассматривать как типовой процесс — физиологический стресс или патологический дистресс. К более частным процессам можно отнести сладж-синдром, метаболический стресс-синдром (токсическое действие мицелл жирных кислот) и другие подобные «синдромы», не имеющие самостоятельных протоколов.

С одной стороны, модель общепатологического процесса является теоретическим фундаментом для формирования моделей клинических дефиниций: нозологий, синдромов, клинических состояний, а с другой — практическая реализация теоретической модели является необходимым условием оценки степени её правдоподобия.

По нашему мнению, формирование принципиальной модели общепатологического процесса СВ зависит от предварительного решения трёх принципиальных задач:

- 1) конкретизация понятий «системная альтерация» и «факторы повреждения»;
- 2) определение клеточного стресса как базового элемента процесса воспаления;
- 3) характеристика цитокинового ответа и СВР при СВ в целом как проявление клеточного стресса на уровне целостного организма.

### Молекулярные паттерны опасности и факторы альтерации

Изначально [5] в качестве ключевых факторов системного повреждения мы рассматривали типовые микробные антигены и продукты тканевого распада, способные при генерализации в кровотоке активировать клетки эндотелия микрососудов и клетки врожденного иммунитета. В последние годы исследования DAMP (danger-associated molecular patterns — молекулярных паттернов, ассоциированных с опасностью) и паттерн-распознающих рецепторов (ПРР) [103] позволили более детально рассмотреть этот феномен.

Молекулы DAMP подразделяют на экзогенные — PAMP (pathogen-associated molecular patterns — патоген-ассоциированные молекулярные паттерны) и эндогенные — алармины [28]. К категории PAMP [15, 16, 103] относят типовые структуры патогенов, прежде всего, компоненты клеточной стенки бактерий и грибов, некоторые вирусные белки, микробные нуклеиновые кислоты. Они имеют особое значение для жизни микроорганизмов, стабильны в процессе их эволюции. Это позволяет их распознавать клетками врожденного иммунитета и потенциальными клетками-мишенями патогенов с помощью ПРР. Наиболее известной группой ПРР у человека являются толл-подобные рецепторы (TLR-1-10) [15, 35, 36, 66, 67].

В свою очередь, к аларминам относят DAMP, высвобождающиеся из повреждённых или патологически активированных клеток [28, 121], а именно: катионные белки (дефенсины, кателицидин и эозинофильный нейротоксин), продукты распада внеклеточного матрикса [119, 125], часть белков теплового шока [73, 94], некоторые кальций-связывающие белки семейства S100 [46], лактоферрин, мочевую кислоту [47], некоторые окисленные, гликозилированные и денатурированные белки [121, 126]. К аларминам также относят цитокин IL-1 $\alpha$  и ядерный негистоновый белок HMGB1, который высвобождается при некрозе клеток, но может секретироваться активированными макрофагами в качестве медиатора [89, 120]. При этом рецептор IL-1 имеет гомологичный с TLR регуляторный TIR-домен, который ассоциирован с индукцией клеточного стресса уже на ранних этапах филогенеза [37], а HMGB1 может взаимодействовать с TLR-2, -4, -9 [89].

Основными признаками аларминов являются [85]:

1. Быстрое выделение из клеток при их повреждении;
2. Привлечение в очаг повреждения и последующая активация антигенпрезентирующих клеток;
3. Иммуностимулирующий эффект на последующих этапах развития иммунного ответа.

Указываются [28] следующие их характеристики:

- 1) выделение из некротических клеток различного типа;

- 2) индуцибельная секреция клетками иммунной системы в качестве медиаторов межклеточного взаимодействия;
- 3) лиганд-рецепторная активация клеток врождённого иммунитета;
- 4) регуляторное участие в регенерации повреждённых тканей.

Большинство ПРР могут связывать несколько разнородных лигандов, а многие представители DAMP — взаимодействовать с различными семействами ПРР. В частности, белок HMGB1 является лигандом не только нескольких TLR, но и рецептора RAGE, который экспрессируется на эндотелиоцитах, перицитах и гладкомышечных клетках сосудов, а также нейронах, макрофагах, гепатоцитах, кардиомиоцитах [74, 120]. Другими лигандами этого рецептора являются патологически гликозилированные белки, некоторые S100 и амилоидные белки. Задействование RAGE связывают со многими тяжёлыми хроническими заболеваниями.

Те или иные наружные ПРР выявляются практически на всех клетках, но наиболее выражено и разнообразно располагаются на поверхности фагоцитов, лимфоцитов, мастоцитов, дендроцитов, эндотелиоцитов и эпителиоцитов [15]. После контакта с лигандом эти ПРР инициируют клеточный стресс, а в определённых случаях и провоспалительную трансформацию клеток, действуя через системы вторичных посредников и транскрипционных факторов. Внутриклеточные ПРР (часть TLR, рецепторы суперсемейства NLR и др.) задействуются при внутриклеточном заражении и различных повреждениях клеток организма. После контакта с лигандами при участии шаперонов и регуляторных белков они формируют инфламмосомы [24, 66].

Взаимодействие ПРР с лигандами на эндотелиоцитах, в частности, липополисахарида грамотрицательных бактерий (LPS) с TLR-4, сопровождается патологической активацией этих клеток [88]. Через ПРР действуют многие продукты тканевого распада, способные инициировать микроциркуляторные расстройства [84].

В последнее время выделили и мембраноассоциированные эндогенные DAMP, а именно, лиганды рецептора NKG2D, который экспрессируется на нормальных киллерах и некоторых субпопуляциях T-киллеров и активированных LPS макрофагах. Лигандами NKG2D являются, кроме отдельных неклассических белков HLA 1-го класса, индуцибельные белки — MICA и MICB [96]. В норме их экспрессия на клетках (эпителиоцитах, эндотелиоцитах, фибробластах) незначительна, но может возрасти при внутриклеточном заражении, опухолевой трансформации и тепловом шоке [34]. Взаимодействие клеток-носителей этих DAMP и экспрессирующих NKG2D клеток-киллеров способствует апоптозу или цитолизу первых из них и активации вторых. Однако не ясно, насколько важны эти механизмы для повреждения эндотелия при СВ.

Связывать PAMP и продукты тканевого распада способны многие интегрины, в том числе ответственные за коллагензависимую агрегацию тромбоцитов, и многие другие рецепторы контактного взаимодействия [123], «рецепторы-мусорщики» макрофагов [51], рецепторы, взаимодействующие с DAMP в комплексе с острофазными белками [117]. Возможно, к ПРР следует отнести рецепторы, связывающие агрессивные протеиназы и их комплексы с антипротеиназами, и ряд других рецепторов. При этом далеко не всегда понятно, когда и какие лиганд-рецепторные взаимодействия могут инициировать развитие воспалительного процесса подобно LPS. Часть ПРР, напротив, можно отнести к факторам противовоспалительной резистентности, в частности, к механизмам «уборки мусора» из кровотока.

В целом, при определении биологической роли DAMP делается акцент на их свойствах активации дендритных клеток (ДК) как основных антигенпрезентирующих клеток (одно из условий инициации адаптивного иммунного ответа) и стимуляции клеток врождённого иммунитета. В качестве примера узко-профессионального подхода приведём одну из последних классификаций DAMP [73]:

1. DAMP (HMGB1 и PAMP), которые через ПРР способствуют дифференцировке примированных антигеном незрелых ДК.

2. Лиганды NKG2D, которые участвуют в активации примированных антигеном ДК через продукцию IFN $\gamma$  и других цитокинов нормальными киллерами.

3. Лиганды NLRP3 (внутриклеточные ПРР): мочевая кислота, окисленный белок TXNIP, микробные нуклеиновые кислоты. Комплекс лиганд-ПРР является ключевым компонентом инфламмосомы-NLRP3, инициирующей в фагоцитирующих и дендритных клетках продукцию IL-1 $\beta$  и IL-18.

4. Неоантигены, распознающиеся нормальными IgM. Далее образовавшиеся иммунные комплексы через комплементсвязывающие рецепторы содействуют трансформации незрелых ДК в антигенпрезентирующие клетки.

Понятие DAMP связано с понятием «повреждающий фактор», поскольку активация клеток врождённого и приобретенного иммунитета, индуцирующих развитие воспаления, развивается не только в ответ на тканевое повреждение, но и на «угрозу» повреждения. Примеры последнего эффекта можно обнаружить при некоторых аутоиммунных и аллергических процессах, отторжении аллотрансплантата, вакцинации непатогенными антигенами. Таким образом, или к категории «факторы повреждения» нужно относить и имитационные факторы, или изменить классическую формулировку воспаления [5, 6, 10, 16]. С учётом этого мы ниже предлагаем уточнённую классификацию факторов повреждения применительно к развитию СВ.

*Факторы системной альтерации*

1. Циркулирующие молекулы, неизбирательно повреждающие клеточные мембраны (свободные радикалы, гидролазы, катионные белки и др.).

2. Системные нарушения гомеостаза: гипоксия, ацидоз, гипертермия и др.

3. Некоторые продукты тканевого распада и микробные антигены, относящиеся к категории DAMP, вызывающие системную «воспалительную» трансформацию эндотелия микрососудов.

4. Антигенспецифичные факторы: циркулирующие иммунные комплексы, цитотоксичные антитела (например, гемолизины), аллергены (при анафилактическом шоке) и некоторые другие.

5. Неиммунные факторы, активирующие в кровотоке систему комплемента и/или гемостаза (эмболия богатыми тканевым фактором околоплодными водами, действие ряда биологических ядов и др.).

Мы не рассматриваем цитокины как повреждающие факторы, поскольку необходимым условием создания модели СВ является чёткое разграничение феноменов СВР и системной альтерации и, соответственно, факторов повреждения и медиаторов воспаления. Последнее разделение будет иногда условным, например, в отношении HMGB1 [54], но не классических цитокинов. Кроме того, цитокины не только усиливают и регулируют клеточный стресс, но и сами являются его продуктами, а при купировании альтерации их продукция быстро снижается. Доказанные в эксперименте критические концентрации IL-1 и TNF $\alpha$  [82, 83] в реальных условиях относительно редки, вероятно, связаны с их системной продукцией, имеют иную динамику возрастания и адаптации организма к их воздействию.

В целом, система DAMP-ПРР в том или ином виде выявляется уже у беспозвоночных (толл-рецепторы были впервые определены у дрозофил) и служит для запуска клеточного ответа на угрозу или начальные (обратимые) этапы повреждения. Она первоначально участвовала в формировании протовоспалительных и палеоиммунных реакций. У человека эти механизмы стали одним из связующих звеньев между врождённым и приобретённым иммунитетом, иммунной и воспалительной реактивностью, а основой всех этих процессов является клеточный стресс как общебиологическое явление.

**Общие закономерности клеточного стресса**

Клеточный стресс можно рассматривать как сумму большого числа универсальных, типовых ответов клетки на действие активационных и повреждающих факторов. Так, наличие стресс-индуцибельных белков, характерных изменений цитоскелета, метаболизма, информационного обмена, закономерное развитие стадий активации и истощения как целостного явления обнаруживают уже у прокариот [1] и растительных клеток [18]. На эти

эволюционно древние универсальные программные механизмы как на основу «наслаиваются» более специализированные механизмы реагирования, связанные с особенностями происхождения и дифференцировки клетки, её микроокружением и характером стимулирующего сигнала. У человека активированные клетки в качестве функциональных элементов дифференцированно включаются в различные физиологические и патологические процессы, поэтому понятие «клеточный стресс» лишено конкретности в отрыве от рассмотрения функциональных систем тканевого и организменного уровня. От этого зависит степень приближения и «угол зрения» рассмотрения клеточного стресса как целостного феномена.

Несмотря на большое число публикаций, посвящённых клеточному стрессу, полученные данные и их обобщения, в целом, носят фрагментированный характер и заключаются в оценке структурных изменений, продукции цитокинов, других индуцибельных медиаторов, свободных радикалов, активации определённых внутриклеточных регуляторных белков и транскрипционных факторов, протективных эффектов белков теплового шока (БТШ). На этих во многом определяющих развитие клеточного стресса белках остановимся подробнее:

- первоначально БТШ охарактеризовали при тепловом шоке, но затем было подтверждено их универсальное значение;

- они относятся к категории шаперонов — молекул, которые в силу прямого контакта способствуют формированию и стабилизации всех типов пространственных структур зависимых от них белков [76];

- предотвращают нежелательные и обеспечивают протективные для клетки молекулярные взаимодействия [44, 98];

- внутри клетки способны связывать и транспортировать в лизосомы необратимо повреждённые белки [12], а также могут связываться с различными протеинкиназами и другими внутриклеточными регуляторными посредниками и модулировать их активность [3];

- БТШ (особенно, БТШ-70) предотвращают апоптоз жизнеспособных клеток, действуя как шапероны и как регуляторные факторы;

- присутствуют во всех клетках в норме, а в условиях стресса их количество существенно возрастает за счёт индуцибельных форм и может достигать 20% от всех белков клетки [12];

- продукцию индуцибельных БТШ запускают транскрипционные факторы (ТФ) теплового шока (HSF) и ряд других ТФ, включая подсемейство FOXO, влияющее на процессы старения [48, 100];

- БТШ-60 и БТШ-70 человека имеют высокую степень гомологии с аналогичными белками бактерий [1, 63], что указывает на общебиологическую роль этих молекул.

БТШ-70 (группа белков массой от 66 до 78 кДа), БТШ-60 (55—64 кДа) и некоторые БТШ-90 (81—99 кДа) относят к категории DAMP, поскольку они могут взаимодействовать с внутриклеточными и наружными ПРР [25, 66]. В последнем случае БТШ секретируются активированными лейкоцитами и «воспалительными» макрофагами или выделяются во внешнюю среду из всех клеток при их разрушении. В качестве шаперонов БТШ могут участвовать в формировании инфламмосом [105]. Во внутриклеточной среде БТШ притормаживают гиперактивацию провоспалительных ТФ (NF-κB, AP-1 и др.) по принципу отрицательной обратной связи, а как межклеточные медиаторы способствуют оптимизации иммунного ответа [91].

В целом, БТШ повышают устойчивость клеток к факторам повреждения. Накопление в крови БТШ является одним из признаков СВР, связанной с генерализацией клеточного стресса. БТШ могут связываться с ПРР, регулируя взаимодействия с этими рецепторами других DAMP.

К другим универсальным проявлениям клеточного стресса можно отнести следующие процессы:

- активация провоспалительных ТФ (включая NF-κB и зависимые от них, примерно, 200 структурных генов у человека), AP-1, фактора индуцируемого гипоксией 1 (HIF-1), HSF-1, EBP-β, CREB, FOXO, NRF-2, E2F, апоптозогенного p53, многих представителей семейств ТФ: STAT, SIRT, TOR, Ets, PI3K/Akt и др. [27, 55, 65, 81, 100, 101];

- экспрессия на клеточной мембране индуцибельных рецепторов, продукция цитокинов и других индуцибельных медиаторов [22, 34];

- подготовка к анаэробному распаду глюкозы — увеличение количества ключевых ферментов дихотомического пути, увеличение уровня определённых синтаз и синтетаз, а также других ферментов, участвующих в репарации клеточных структур [70];

- усиление или, напротив, критическое снижение основного энергетического обмена;

- увеличение концентрации цитоплазматического Ca<sup>2+</sup>, участвующего в регуляции и/или непосредственной реализации всех основных физиологических и экстремальных клеточных функций [70];

- активация микросомального окисления и развитие оксидантного стресса [70] — необходимого условия для синтеза многих стресс-молекул, обезвреживания токсинов и реализации прямых регуляторных эффектов свободных радикалов, включая их активационное действие на ТФ, например: NF-κB, HIF-1 [55, 70], p53 [109], как и многие протеинкиназы, включая некоторые эволюционно связанные с клеточным стрессом митоген-активируемые протеинкиназы [60, 118];

- вследствие оксидантного стресса и других причин [13] возрастает готовность клетки к апоптозу, но

при этом целый ряд факторов, включая и БТШ [61], повышает устойчивость клетки к его развитию, что в условиях нарастающего действия повреждающих факторов может способствовать как выживанию клетки, так и развитию некроза [71];

- в отдельных случаях клеточный стресс связан с пролиферативной активностью, например, при действии антигеннеспецифичных лимфоцитарных митогенов *in vitro*;

- при клеточном стрессе происходит развитие разнонаправленных процессов по варианту «эффект — контрэффект», что позволяет рассматривать клетку как внутренне противоречивую систему, поведение которой зависит от условий микроокружения, характера повреждающего воздействия, типа и исходного состояния клетки, особенностей её генома.

Клеточный стресс на действие повреждающих факторов является базовым функциональным элементом для формирования более сложных программ межклеточного взаимодействия, включая протовоспалительные и палеоиммунные процессы у беспозвоночных, воспаления и адаптивного иммунного ответа у человека. С учётом вышеизложенного, мы предложили классификацию стадий клеточного стресса как базового элемента развития СВ [6, 9], которую схематично приводим с некоторыми уточнениями на рисунке.

*Стадия 1 — Физиологическая стадия клеточного стресса.* Активация физиологических функций и их перераспределение в ответ на стимулы нейроэндокринных и иных регуляторных факторов, в частности, опосредующих СВР при классическом воспалении, приоритетно направленных на ресурсное обеспечение процессов очага воспаления.

*Стадия 2 — воспалительного обратимого клеточного стресса.* Реакция клеток на действие факторов повреждения, сопровождающаяся «воспалительной трансформацией» клетки, при классическом воспалении реализуется преимущественно в очаге воспаления, а при СВ — системно, во всём бассейне микроциркуляторного русла, с дальнейшим распространением и на паренхиматозные клетки жизненно важных органов. В первом случае ведущую патогенетическую роль играют клетки воспалительного инфильтрата (лейкоциты и «воспалительные» макрофаги), а во втором — клетки-резиденты микрососудов (прежде всего, эндотелиоциты и стромальные макрофаги). Физиологические функции клеток снижены или патологически изменены, что является основой микроциркуляторных расстройств (шок, ПОН, ДВС-синдром).

Процессы активации и торможения могут характеризовать две фазы — гиперэргическую и гипоэргическую, отражающие возможность циклических изменений в рамках этой стадии. Первая фаза характеризуется высокой провоспалительной активностью



клетки, включая продукцию цитокинов, повышенным уровнем основного обмена; физиологические функции при этом сохранены или снижены; основная стратегия поведения на действие повреждающих агентов — резистентность. Для второй фазы свойственно снижение основного обмена и функциональной активности, как физиологической, так и провоспалительной; стратегия — толерантность. Фазы могут проявляться в виде тенденции, поскольку они формируются большим количеством не полностью синхронизированных молекулярных циклов.

*Стадия 3. Депрессивная стадия клеточного стресса.* Характеризуется устойчивым, трудно обратимым тотальным снижением функциональной активности, высоким риском развития апоптоза или некробиоза, в последнем случае, с образованием продуктов клеточного распада. Основными причинами развития депрессивной стадии являются или за пределами интенсивное воздействие факторов повреждения, или их относительно длительное (истощающее) действие. Известные примеры этой стадии: феномен «сорванного фагоцитоза» нейтрофилов и длительное, но безуспешное противостояние депрессивных макрофагов заселяющим их микобактериям [26].

На уровне организма провоспалительная активность клеток в различных органах может быть мозаичной и динамичной, например, при экспериментальном сепсисе [33]. Таким образом, различные стадии клеточного стресса могут развиваться в организме одновременно, а интегрально можно зафиксировать только относительное преобладание той или иной из них по уровню молекул — маркеров клеточного стресса в крови при учёте других феноменов системного воспаления [10].

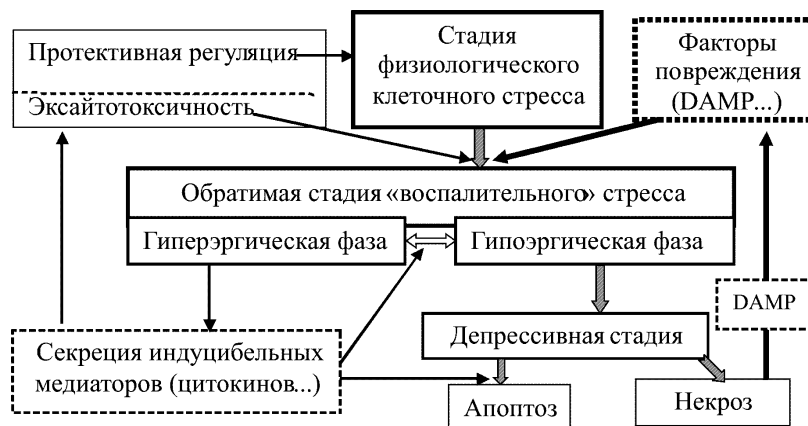
Характерным свойством активированных клеток человека, вовлечённых в процесс воспаления, является продукция того или иного спектра гистогормонов белковой природы — цитокинов.

### Цитокины как патогенетические факторы и критерии СВР

Секреция цитокинов и других медиаторов воспаления является внешним проявлением клеточного стресса. Поэтому цитокины представляют интерес не только как регуляторные факторы, но и как маркеры и количественные показатели воспалительной трансформации различных клеток как на местном (при классическом воспалении), так и на системном уровне (при СВ).

Относительно биологической роли цитокинов в последнее время вышло большое количество обобщающей литературы [11, 59, 97]. Отметим наиболее принципиальные положения:

- цитокины являются ведущими гуморальными посредниками межклеточного информационного обмена при воспалении, реализации врождённого и приобретённого иммунитета, регенерации и репарации (склерозирования) повреждённых тканей;
- к цитокинам относятся более 100 белковых молекул, действующих на клеточные рецепторы аутокринно, паракринно, а в отдельных случаях и длиннодистантно через систему кровотока;
- секреция большинства цитокинов и экспрессия их рецепторов на поверхности клеток носит преимущественно индуцибельный характер, некоторые цитокины могут продуцироваться и в физиологических условиях, но, как правило, с существенно меньшей интенсивностью;
- к секреции цитокинов способны, в той или иной степени, практически все ядродержащие клетки и тромбоциты, но в наибольшей степени — клетки, непосредственно участвующие в реализации воспалительной реактивности и иммунного ответа;
- действие цитокинов отличается регуляторной избыточностью: один цитокин может взаимодействовать с несколькими рецепторами, с различной функцией и действовать дифференцированно на многие типы клеток, но разные рецепторы и разные цитокины



Стадии и фазы провоспалительного клеточного стресса и действие на них активационных факторов

могут реализовывать и однонаправленные биологические эффекты на уровне клетки;

- биологические эффекты цитокин-рецепторных взаимодействий на клетке при разных её функциональных состояниях могут существенно различаться;

- регуляторные эффекты цитокинов на уровне клетки в значительной степени реализуются посредством активации и ингибирования универсальных (коллекторных) ТФ — индукторов и регуляторов генетических программ клеточного стресса, включая и семейство NF-κB;

- цитокины действуют на клетку каскадно, стимулируя или ингибируя как продукцию и секрецию других цитокинов, так и экспрессию цитокин-связывающих рецепторов и другие индуцибельные процессы;

- взаимодействующие друг с другом активированные клетки в очаге воспаления и в реагирующих на антигены лимфоидных органах формируют тот или иной динамический вариант цитокиновой сети с возможными эндокринными (длиннодистантными) эффектами отдельных цитокинов практически на все органы и ткани организма;

- цитокины регулируют все процессы, ассоциированные с СВР: лихорадку, острофазный ответ, реакцию костного мозга и выход лейкоцитов из депо, развитие общего адаптационного синдрома;

- часть цитокинов может служить молекулярными маркерами СВР, прежде всего: IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, TNFα, IL-1ra (рецепторный антагонист), MIP-(1, 2), MCP-(1, 2), RANTES, IP-10, IFNα и γ, TGFβ, G-CSF, GM-CSF, PDGF, VEGF [10, 11, 17, 45, 50, 53, 97], а также растворимые рецепторы к TNF, IL-1 (ST2), IL-2 (CD25), VEGF, хемокинам (CCR-2 и 3) [10, 90].

Изменения уровня цитокинов в крови при СВ характеризуются существенными отклонениями от нормальных значений (в отдельных случаях в тысячи раз), хаотичностью, фазностью, низкой корреляцией между собой.

Общей закономерностью гиперцитокинемии при критических состояниях являются, во-первых, относительно невысокие концентрации преимущественно лимфоцитарных цитокинов (например, IL-2, IL-4), за исключением IFNγ при острых вирусных инфекциях [17, 72]. Во-вторых, как правило, относительно более умеренные и/или кратковременные изменения при шоковых состояниях концентраций TNFα и IL-1β, в сравнении с IL-6, обладающим также полифункциональным, но более «мягким» провоспалительным действием [64, 69]. В-третьих, цитокины действуют кооперативно с другими регуляторными факторами: острофазными белками, биогенными аминами, производными липидов (эйкозаноиды, церамиды, тромбоцит активирующий фактор), NO, катионными белками гранулоцитов, регуляторными факторами комплекса, гемостаза и калликреин-кининовой системы,

белками теплового шока, традиционными гормонами и многими гистогормонами (лептин, эндотелины, ангиотензин II и др.), регуляторными метаболитами и рецепторами контактного взаимодействия. Многие частные представители из этого неполного списка также могут выступать в качестве маркеров СВР.

Высокие концентрации отдельных цитокинов в крови относительно специфичны к развитию септического шока (IL-1β, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IFNα, MCP-1, TNFα) [45, 75], ПОН (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-1ra, MCP-1, G-CSF, GM-CSF), синдрома ДВС (чаще других выделяют IL-8), летальным исходам (IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, IL-1ra, MCP-1, G-CSF, GM-CSF, MIP-1 и 2, TNFα) [90], а дополнительно для тяжелых вирусных инфекций — IFNγ [17, 38, 43, 116] и IP-10 [40, 52, 122]. В то же время нелинейность этой взаимосвязи, нестабильность концентраций цитокинов в крови ограничивает их использование в качестве диагностических и прогностических критериев тяжести состояния. Вероятно, вследствие этого до настоящего времени основными дополнительными критериями бактериального сепсиса являются С-реактивный протеин (CRP) и прокальцитонин (PCT) плазмы крови [53, 79, 93, 99, 106], которые имеют существенно более длительный период полувыведения в сопоставлении с цитокинами. Между тем, по этой же причине они хуже отражают динамику СВР. Кроме того, уровень CRP относительно слабо коррелирует с тяжестью состояния [30], а уровень PCT в крови больше связан с генерализацией бактериальных антигенов, чем с другими причинами СВ [2]. Также на сегодняшний день нет четких представлений о биологической роли PCT как фактора СВР [32]. Учитывая вышесказанное, в настоящее время некоторыми авторами высказывается мнение о необходимости разработки интегральных критериев СВР, основанных на определении в крови нескольких молекулярных маркеров СВР, включая и цитокины [41, 90].

Остановимся на преимуществах цитокинов как критериев СВР:

- 1) понятна и значима биологическая роль;
- 2) являются продуктами стресс-реакции многих типов клеток на различные стимулы;
- 3) имеется большая выборка провоспалительных и условно противовоспалительных цитокинов, концентрации которых в крови характеризуются высокой амплитудой изменений;
- 4) оптимальный период полувыведения из кровотока — несколько десятков минут;
- 5) наличие апробированных, стандартизованных методов их количественного определения и разносторонних баз данных клинических и экспериментальных исследований по многим цитокинам.

Однако перечисленные положительные качества цитокинов в полной мере могут проявить себя только при использовании интегральных критериев СВР и СВ в целом (с учетом критериев других феноменов процесса).

Учитывая вышесказанное, мы используем некоторые цитокины (IL-6, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ ) и CRP в интегральной шкале оценки уровней СВР [7, 8, 9]. В то же время не исключаем использование в этих целях других информативных цитокинов, БТШ, растворимых рецепторов цитокинов и адгезии эндотелиоцитов, маркеров внутрисосудистой активации гранулоцитов и других продуктов клеточного стресса [7]. Центральной задачей шкалы СВР является дифференцировка местной и системной продукции медиаторов и, соответственно, проявлений СВР при классическом и системном воспалении. При этом необходимо учитывать то, что СВР является не единственным феноменом СВ (частным процессом), а при гипоэргических вариантах СВ, возможно, даже и не основным [6, 10].

Таким образом, факторы повреждения инициируют развитие клеточного стресса на уровне отдельных органов как необходимого условия развития воспаления. Необходимым условием для этого является формирование цитокиновой сети как саморегулируемого процесса. Однако формирование функциональных систем воспаления происходит при кооперации цитокиновой сети с другими факторами информационного обмена. При этом цитокины действуют по принципиальным механизмам регуляции сложных систем — положительной и, одновременно, отрицательной прямой и обратной связи. Критически высокие уровни многих цитокинов в крови могут быть критериями системного провоспалительного стресса, атрибутного спутника критических микроциркуляторных расстройств и других проявлений СВ.

### Заключение

СВ является сложным, внутренне противоречивым и драматическим по своим последствиям процессом. Известные признаки очага воспаления не могут отразить образ СВ. Исторически изучение СВ было связано с решением клинических задач, и процесс был охарактеризован с помощью синдромальных моделей. СВ инициируют: генерализация РАМР при инфекции, аллергенов — при анафилактическом шоке, продуктов тканевого распада — при краш-синдроме, богатых тканевым фактором околоплодных вод, а также гипоксия и ацидоз при травматическом шоке и другие факторы системного повреждения. Сутью СВ является генерализация воспалительного клеточного стресса, прежде всего, эндотелиоцитов и сосудистых макрофагов, как основа микроциркуляторных расстройств. Наличие и распространённость системного клеточного стресса могут отражать определённые уровни в крови медиаторов воспаления и,

прежде всего, цитокинов. Модель СВ как общепатологического процесса должна основываться на наиболее принципиальных признаках этого процесса, и её значение заключается не в решении конкретных практических задач, а в создании теоретической и методологической основы для их решения.

### Список литературы

1. *Баснакьян И.А.* Стресс у бактерий. — М.: Медицина, 2003. — 136 с.
2. *Гельфанд Б.Р., Бурневич С.З., Гельфанд Е.Б.* и др. Биохимические маркеры системной воспалительной реакции: роль прокальцитонина в диагностике сепсиса // Инфекции в хирургии. — 2007. — Т. 5, №1. — С. 19-24.
3. *Глушкова О.В., Новоселова Т.В., Хренов М.О.* и др. Роль белка теплового шока Hsp90 в формировании защитных ответов при остром и токсическом стрессе // Биохимия. — 2010. — Т. 75, №6. — С. 789-795.
4. *Гурьянов В.А., Пырегов А.В., Толмачев Г.Н., Володин А.В.* Общий адаптационный синдром и беременность. Беременность с позиций общего адаптационного синдрома // Анестезиология и реаниматология. — 2007. — №6. — С. 4-8.
5. *Гусев Е.Ю., Осипенко А.В.* Иммунология системного воспаления // иммунология Урала. — 2001. — Т. 1, №1. — С. 4-8.
6. *Гусев Е.Ю., Черешнев В.А., Юрченко Л.Н.* Системное воспаление с позиции теории типового патологического процесса // Цитокины и воспаление. — 2007. — Т. 6, №4. — С. 9-21.
7. *Гусев Е.Ю., Юрченко Л.Н., Черешнев В.А., Зотова Н.В.* Методология изучения системного воспаления // Цитокины и воспаление. — 2008. — Т. 7, №1. — С. 15-23.
8. *Гусев Е.Ю., Черешнев В.А., Журавлёва Ю.А.* и др. Хроническое системное воспаление как типовой патологический процесс // Цитокины и воспаление. — 2008. — №4. — С. 3-11.
9. *Гусев Е.Ю., Зотова Н.В., Сипачев А.С.* Травма и теория системного воспаления // Вест. Анест. Реаним. — 2009. — Т. 6, №2. — С. 2-10.
10. *Гусев Е.Ю., Черешнев В.А.* Системное воспаление: теоретические и методологические подходы к описанию модели общепатологического процесса. Часть 1. Общая характеристика процесса // Патол. физиол. и эксп. терапия. — 2012. — №4. — С. 3-14.
11. *Кетлинский С.А., Симбирцев А.С.* Цитокины. — СПб.: Фолиант, 2008. — 552 с.
12. *Коржов В.И., Коржов М.В., Пунщикова Е.А., Сахненко А.С.* Белки теплового шока (обзор литературы) // Журн. АМН Украины. — 2008. — Т. 14, №1. — С. 26-42.
13. *Матвеева Н.Ю.* Апоптоз: морфологические особенности и молекулярные механизмы // Тихоокеанский медицинский журнал. — 2003. — №4. — С. 12-16.
14. *Маянский А.Н.* Современная эволюция идеи И.И. Мечникова о внутрисосудистом воспалении // Иммунология. — 1995. — №4. — С. 8-15.
15. *Меджитов Р., Джаневей Ч.* Врожденный иммунитет // Казанский медицинский журнал. — 2004. — Т. 85, №3. — С. 161-167.
16. Молекулярные механизмы воспаления: Учебное пособие / Под ред. В.А. Черешнева. — Екатеринбург: УрО РАН, 2010. — 264 с.
17. *Носик Н.Н.* Цитокины при вирусных инфекциях // Вопросы вирусологии. — 2000. — №1, Т. 45. — С. 4-10.

18. **Пятыгин С.С.** Стресс у растений: физиологический подход // Журн. общ. биологии. — 2008. — Т. 69, №4. — С. 294-298.
19. Сепсис в начале XXI века. Классификация, клинико-диагностическая концепция и лечение. Патолого-анатомическая диагностика: Практическое руководство / Под ред. В.С. Савельева, Б.П. Гельфанда. — М.: Литтерра, 2006. — 176 с.
20. **Серов В.Н., Медвинский И.Д., Юрченко Л.Н.** и др. Тяжелый гестоз с позиции синдрома системного воспалительного ответа // Вестник интенсивной терапии. — 2003. — №1. — С. 19-26.
21. **Черешнев В.А., Гусев Е.Ю., Зотова Н.В.** Фундаментально-прикладные аспекты системного воспаления с позиции теории физиологических и типовых патологических процессов // РФЖ им. И. М. Сеченова. — 2010. — Т. 96, №7. — С. 696-707.
22. **Ярулин А.А.** Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и при патологии // Иммунология. — 1997. — №5. — С. 7-13.
23. **Adib-Conquy M., Cavaillon J.M.** Compensatory anti-inflammatory response syndrome // Thromb. Haemost. — 2009. — Vol. 101, №1. — P. 36-47.
24. **Alnemri E.S.** Sensing cytoplasmic danger signals by the inflammasome // J. Clin. Immunol. — 2010. — Vol. 30, №4. — P. 512-519.
25. **Asea A., Kraeft S.K., Kurt-Jones E.A.** et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine // Nature Med. — 2000. — Vol. 6, №4. — P. 435-442.
26. **Berrington W.R., Hawn T.S.** Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? // Immunol. Rev. — 2007. — Vol. 219. — P. 167-186.
27. **Bertges D.J., Fink M.P., Delude R.L.** Hypoxic signal transduction in critical illness // Crit. Care Med. — 2000. — Vol. 28, №4. — P. 78-86.
28. **Bianchi M.** DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger // J. Leukoc. Biol. — 2007. — Vol. 81, №1. — P. 1-5.
29. **Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B.** et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis // Chest. — 1992. — Vol. 101, №6. — P. 1644-1655.
30. **Brunckhorst F.M., Wegscheider K., Forycki Z.F.** et al. Procalcitonin for early diagnosis and differentiation of SIRS, sepsis, severe sepsis, and septic shock // Intensive Care Med. — 2000. — Vol. 26, №2 Suppl. — P. 148-152.
31. **Carre J.E., Singer M.** Cellular energetic metabolism in sepsis: The need for a systems approach // Biochimica et Biophysica Acta. — 2008. — Vol. 1777, №7-8. — P. 763-771.
32. **Castelli G.P., Pognani C., Meisner M.** et al. Procalcitonin and C-reactive protein during systemic inflammatory response syndrome, sepsis and organ dysfunction // Critical Care. — 2004. — Vol. 8, №4. — P. 234-242.
33. **Cavaillon J.-M., Annane D.** Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS // J. Endotoxin Res. — 2006. — Vol. 12, №3. — P. 151-170.
34. **Champsaur M., Lanier L.L.** Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses // Immunol. Rev. — 2010. — Vol. 235, №1. — P. 267-285.
35. **Chang Z.L.** Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways // Inflamm. Res. — 2010. — Vol. 59, №10. — P. 791-808.
36. **Chaturvedi A., Pierce S.K.** How location governs toll-like receptor signaling // Traffic. — 2009. — Vol. 10, №6. — P. 621-628.
37. **Chen C.J., Kono H., Golenbock D.** et al. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells // Nature Med. — 2007. — Vol. 13, №7. — P. 851-856.
38. **Cheung C.Y., Poon L.L.M., Ng I.H.Y.** et al. Possible Relevance to Pathogenesis Coronavirus-Infected Macrophages In Vitro: Respiratory Syndrome Cytokine Responses in Severe Acute // J. Virol. — 2005. — Vol. 79, №12. — P. 7819-7826.
39. **Chierago M., Verdant C., De Backer D.** Microcirculatory alterations in critically ill patients // Minerva Anestesiologica. — 2006. — Vol. 72, №4. — P. 199-205.
40. **Cole K.E., Strick C.A., Paradis T.J.** et al. Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3 // J. Exp. Med. — 1998. — Vol. 187, №12. — P. 2009-2021.
41. **Davis J.M., Knutson K.L., Strausbauch M.A.** et al. Analysis of Complex Biomarkers for Human Responsiveness of Peripheral Blood Cells Immune-Mediated Disorders Based on Cytokine // J. Immunol. — 2010. — Vol. 184, №12. — P. 7297-7304.
42. **De Backer D., Dubois M.-J., Schartz D.** et al. Microcirculatory Alterations in Cardiac Surgery: Effects of Cardiopulmonary Bypass and Anesthesia // Ann. Thorac. Surg. — 2009. — Vol. 88, №5. — P. 1396-1403.
43. **De Bruin A.M., Libregts S.F., Valkhof M.** et al. IFN $\gamma$  induces monopoiesis and inhibits neutrophil development during inflammation // Blood. — 2012. — Vol. 119, №6. — P. 1543-1554.
44. **De Maio A.** Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: A form of communication during injury, infection, and cell damage // Cell Stress and Chaperones. — 2011. — Vol. 16, №3. — P. 235-249.
45. **Fiers W.** Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level // FEBS. — 1991. — Vol. 285, №2. — P. 199-212.
46. **Foell D., Wittkowski H., Vogl T., Roth J.** S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules // J. Leukoc. Biol. — 2007. — Vol. 81, №1. — P. 28-37.
47. **Ghaemi-Oskouie F., Shi Y.** The role of uric acid as an endogenous danger signal in immunity and inflammation // Curr. Rheumatol. Rep. — 2011. — Vol. 13, №2. — P. 160-166.
48. **Glauser D.A., Schlegel W.** The emerging role of FOXO transcription factors in pancreatic  $\beta$  cells // J. Endocrinol. — 2007. — Vol. 193, №2. — P. 195-207.
49. **Glenn E.M., Bowman B.J., Koslowski T.C.** The systemic response to inflammation // Biochemical pharmacology. — 1968. — Mar: Suppl. — P. 27-49.
50. **Gogos C.A., Drosou E., Bassaris H.P., Skoutelis A.** Pro-versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options // J. Infect. Diseases. — 2000. — Vol. 181, №1. — P. 176-180.
51. **Greaves D.R., Gordon S.** The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges // J. Lipid. Res. — 2009. — Vol. 50 (Supplement). — P. 282-286.
52. **Groom J.R., Luster A.D.** CXCR3 in T cell function // Exp. Cell Res. — 2011. — Vol. 317, №5. — P. 620-631.
53. **Harbarth S., Holeckova K., Froidevaux C.** et al. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2001. — Vol. 164, №3. — P. 396-402.
54. **Harris H.E., Raucchi A.** Alarmin(g) news about danger: workshop on innate danger signals and HMGB1 // EMBO Rep. — 2006. — Vol. 7, №8. — P. 774-778.
55. **Helmreich E.J.M.** The Biochemistry of Cell Signaling. Oxford University Press, USA, 2001. — 368 p.

56. **Hirasawa H., Oda S., Nakamura M.** Blood glucose control in patients with severe sepsis and septic shock // *World J. Gastroenterol.* — 2009. — Vol. 15, №33. — P. 4132-4136.
57. **Huisse M.-G., Pease S., Hurtado-Nedelec M.** et al. Leukocyte activation: The link between inflammation and coagulation during heatstroke. A study of patients during the 2003 heat wave in Paris // *Crit. Care Med.* — 2008. — Vol. 36, №8. — P. 2288-2295.
58. **Jaimes F., Garcns J., Cuervo J.** et al. The systemic inflammatory response syndrome (SIRS) to identify infected patients in the emergency room // *Inten. Care Med.* — 2003. — Vol. 29, №8. — P. 1368-1371.
59. **Jawa R.S., Kulaylat M.N., Baumann H., Dayton M.T.** What is new in cytokine research related to trauma? // *J. Intensive Care Med.* — 2006. — Vol. 21, №2. — P. 63-85.
60. **Jeong E., Lee J.Y.** Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors // *Yonsei Med. J.* — 2011. — Vol. 52, №3. — P. 379-392.
61. **Joly A.L., Wettstein G., Mignot G.** Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity // *J. Innate Immun.* — 2010. — Vol. 2, №3. — P. 238-247.
62. **Jones G.R., Lowes J.A.** The systemic inflammatory response syndrome as a predictor of bacteraemia and outcome from sepsis // *Q. J. Med.* — 1996. — Vol. 89, №7. — P. 515-522.
63. **Karlin S., Brocchieri L.** Heat shock protein 60 sequence comparisons: Duplications, lateral transfer, and mitochondrial evolution // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2000. — Vol. 97, №21. — P. 11348-11353.
64. **Katja B., Hartmut K., Pawel M.** et al. The value of immune modulating parameters in predicting the progression from peritonitis to septic shock // *Shock.* — 2001. — Vol. 15, №2. — P. 95-100.
65. **Kawai T., Akira S.** Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors // *Trends Mol. Med.* — 2007. — Vol. 13, №11. — P. 460-469.
66. **Kawai T., Akira S.** The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition // *Int. Immunol.* — 2009. — Vol. 21, №4. — P. 317-337.
67. **Kawai T., Akira S.** Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity // *Immunity.* — 2011. — Vol. 34, №5. — P. 637-650.
68. **Klijn E., Den Uil C.A., Bakker J., Ince C.** The heterogeneity of the microcirculation in critical illness // *Clin. Chest. Med.* — 2008. — Vol. 29, №4. — P. 643-654.
69. **Klosterhalfen B., Bhardwaj R.S.** Septic Shock // *Gen. Pharmac.* — 1998. — Vol. 31, №1. — P. 25-32.
70. **Koch T., Funk R.H.W.** Zelluläre Dysfunktion in der Pathogenese des Organversagens // *Anaesthesist.* — 2001. — Vol. 50, №10. — P. 742-749.
71. **Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P.** et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009 // *Cell Death Differ.* — 2009. — Vol. 16, №1. — P. 3-11.
72. **La Gruta N.L., Kedzierska K., Stambas J., Doherty P.C.** A question of self-preservation: immunopathology in influenza virus infection // *Immunol. Cell Biol.* — 2007. — Vol. 85, №2. — P. 85-92.
73. **Land W.G.** Role of heat shock protein 70 in innate alloimmunity // *Front. Immunol.* — 2012. — Vol. 89, №2. — P. 1-6.
74. **Liliensiek B., Weigand M.A., Bierhaus A.** et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response // *J. Clin. Invest.* — 2004. — Vol. 113, №11. — P. 1641-1650.
75. **Lvovschi V., Arnaud L., Parizot C.** et al. Cytokine profiles in sepsis have limited relevance for stratifying patients in the emergency department: A prospective observational study // *PLoS One.* — 2011. — Vol. 6, №12. — e28870.
76. **Macario A.J.L., de Macario E.C.** Sick Chaperones, Cellular Stress, and Disease // *N. Engl. J. Med.* — 2005. — Vol. 353, №14. — P. 1489-1501.
77. **Mechnikov I.I.** Immunity in infective diseases. By И'я И'ич Мечников, 1905 // *Rev. Infect. Dis.* — 1988. — Vol. 10, №1. — P. 223-227.
78. **Meeran H., Messent M.** The systemic inflammatory response syndrome // 2001. — *Trauma.* — 2001. — Vol. 3. — P. 89-100.
79. **Meynaar I.A., Droog W., Batstra M.** et al. In critically ill patients, serum procalcitonin is more useful in differentiating between sepsis and SIRS than CRP, IL-6, or LBP // *Crit. Care Res. Pract.* — 2011. — Vol. 2011. — doi: 10.1155/2011/594645.
80. **Monneret G.** How to identify systemic sepsis-induced immunoparalysis // *Advances in Sepsis.* — 2005. — Vol. 4, №2. — P. 42-49.
81. **Murray-Zmijewski F., Lane D.P., Bourdon J.C.** p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress // *Cell Death Differ.* — 2006. — Vol. 13, №6. — P. 962-972.
82. **Natanson C., Eichenholz P.W., Danner R.L.** et al. Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock // *J. Exp. Med.* — 1989. — Vol. 169, №3. — P. 823-832.
83. **Okusawa S., Gelfand J.A., Ikejima T.** et al. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits // *J. Clin. Invest.* — 1988. — Vol. 81, №4. — P. 1162-1172.
84. **Opitz B., Eitel J., Meixenberger K., Suttrop N.** Role of Toll-like receptors, NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in endothelial cells and systemic infections // *Thromb. Haemost.* — 2009. — Vol. 102, №6. — P. 1103-1109.
85. **Oppenheim J.J., Yang D.** Alarmins: chemotactic activators of immune responses // *Curr. Opin. Immunol.* — 2005. — Vol. 17, №4. — P. 359-365.
86. **Ostanin A.A., Leplina O.Y., Shevela C.Y.** Inflammatory Syndromes (SIRS, MARS, CARS) in Patients with Surgical Infection // *Russ. J. Immunol.* — 2000. — Vol. 5, №3. — P. 289-300.
87. **Osuchowski M.F., Welch K., Siddiqui J., Remick D.G.** Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality // *J. Immunol.* — 2006. — Vol. 177, №3. — P. 1967-1974.
88. **Oude Nijhuis C.S., Vellenga E., Daenen S.M.** et al. Endothelial cells are main producers of interleukin 8 through Toll-like receptor 2 and 4 signaling during bacterial infection in leukopenic cancer patients // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* — 2003. — Vol. 10, №4. — P. 558-563.
89. **Park J.S., Gamboni-Robertson F., He Q.** High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* — 2006. — Vol. 290, №3. — P. 917-924.
90. **Pierrakos C., Vincent J.-L.** Sepsis biomarkers: a review // *Crit. Care.* — 2010. — Vol. 14, №1. — P. 15-33.
91. **Pockley A.G., Muthana M., Calderwood S.K.** The dual immunoregulatory roles of stress proteins // *Trends Biochem. Sci.* — 2008. — Vol. 33, №2. — P. 71-79.
92. **Povoa P.** C-reactive protein: a valuable marker of sepsis // *Intensive Care Med.* — 2002. — Vol. 28, №3. — P. 235-243.
93. **Povoa P., Coelho L., Almeida E.** et al. C-reactive protein as a marker of infection in critically ill patients // *Clin. Microbiol. Infect.* — 2005. — Vol. 11, №2. — P. 101-108.
94. **Quintana F.J., Cohen I.R.** Heat shock proteins as endogenous adjuvants in sterile and septic inflammation // *J. Immunol.* — 2005. — Vol. 175, №5. — P. 2777-2782.
95. **Rangel-Frausto M.S., Pittet D., Costigan M.** et al. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) // *JAMA.* — 1995. — Vol. 273, №2. — P. 117-123.

96. **Raulet D.H.** Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands // *Nat. Rev. Immunol.* — 2003. — Vol. 3, №10. — P. 781-790.
97. **Rodríguez M., Santolaria F., Jarque A.** et al. Prognostic value of cytokines in SIRS general medical patients // *Cytokine.* — 2001. — Vol. 15, №4. — P. 232-236.
98. **Ryckman C., Vandal K., Rouleau P.** et al. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion // *J. Immunol.* — 2003. — Vol. 170, №6. — P. 3233-3242.
99. **Schuetz Ph., Christ-Crain M., Muller B.** Procalcitonin and other biomarkers for the assessment of disease severity and guidance of treatment in bacterial infections // *Advances in sepsis.* — 2008. — Vol. 6, №3. — P. 82-89.
100. **Senf S.M., Dodd S.L., Judge A.R.** FOXO signaling is required for disuse muscle atrophy and is directly regulated by Hsp70 // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* — 2010. — Vol. 298, №1. — P. 38-45.
101. **Senf S.M., Dodd S.L., McClung J.M., Judge A.R.** Hsp70 over expression inhibits NF-kappaB and Foxo3a transcriptional activities and prevents skeletal muscle atrophy // *FASEB J.* — 2008. — Vol. 22, №11. — P. 3836-3845.
102. **Shapiro N., Howell M.D., Bates D.W.** et al. The association of sepsis syndrome and organ dysfunction with mortality in emergency department patients with suspected infection // *Ann. Emerg. Med.* — 2006. — Vol. 48, №5. — P. 583-590.
103. **Sirisinha S.** Insight into the mechanisms regulating immune homeostasis in health and disease // *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* — 2011. — Vol. 29, №1. — P. 1-14.
104. **Skrobik Y., Kavanagh B.P.** Scoring systems for the critically ill: use, misuse and abuse // *Canad. J. Anesth.* — 2006. — Vol. 53, №5. — P. 432-436.
105. **Tsan M.-F., Gao B.** Heat shock proteins and immune system // *J. Leukoc. Biol.* — 2009. — Vol. 85, №6. — P. 905-910.
106. **Usitalo-Seppala R., Koskinen P., Leino A.** et al. Early detection of severe sepsis in the emergency room: diagnostic value of plasma C-reactive protein, procalcitonin, and interleukin-6 // *Scand. J. Infect. Dis.* — 2011. — Vol. 43, №11-12. — P. 883-890.
107. **Van Amersfoort E.S., Van Berkel T.J., Kuiper J.** Receptors, Mediators, and Mechanisms Involved in Bacterial Sepsis and Septic Shock // *Clin. Microbiol. Rev.* — 2003. — Vol. 16, №3. — P. 379-414.
108. **Van der Poll T.** Coagulation and inflammation // *Journal of Endotoxin Research.* — 2001 — Vol. 7, №4. — P. 301-303.
109. **Velez J.M., Miriyala S., Nithipongyanitch R.** et al. p53 Regulates oxidative stress-mediated retrograde signaling: a novel mechanism for chemotherapy-induced cardiac injury // *PLoS One.* — 2011. — Vol. 6, №3. — e18005.
110. **Vincent J.L.** Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you // *Crit. Care Med.* — 1997. — Vol. 25, №2. — P. 372-374.
111. **Vincent J.L.** Metabolic support in sepsis and multiple organ failure: more questions than answers // *Crit. Care Med.* — 2007. — Vol. 35, №9 Suppl. — P. 436-440.
112. **Vincent J.-L., Byl B.** Defining a clinical syndrome of systemic inflammation // *Sepsis.* — 2000. — Vol. 4, №1. — P. 15-19.
113. **Vincent J.L., Martinez E.O., Silva E.** Evolving concepts in sepsis definitions // *Crit. Care Clin.* — 2009. — Vol. 25, №4. — P. 665-675.
114. **Volk H.D., Reinke P., Docke W.D.** Clinical aspects: From systemic inflammation to «immunoparalysis» // *Chem. Immunol.* — 2000. — Vol. 74. — P. 162-177.
115. **Ward N.S., Casserly B., Ayala A.** The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients // *Chest Med.* — 2008. — Vol. 29, №4. — P. 617-625.
116. **Whitmire J.K., Tan J.T., Whitton J.L.** Interferon-γ acts directly on CD8+ T cells to increase their abundance during virus infection // *JEM.* — 2005. — Vol. 201, №7. — P.1053-1059.
117. **Wright S.D., Ramos R.A., Tobias P.S.** et al. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein // *Science.* — 1990. — Vol. 249, №4975. — P. 1431-1433.
118. **Yamada T., Egashira N., Bando A.** et al. Activation of p38 MAPK by oxidative stress underlying epirubicin-induced vascular endothelial cell injury // *Free Radic. Biol. Med.* — 2012. — Vol. 52, №8. — P. 1285-1293.
119. **Yang D., Biragyn A., Hoover D.M.** et al. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense // *Annu. Rev. Immunol.* — 2004. — Vol. 22. — P. 181-215.
120. **Yang D., Chen Q., Yang H.** et al. High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin // *J. Leukoc. Biol.* — 2007. — Vol. 81, №1. — P. 59-66.
121. **Yang D., de la Rosa G., Tewary P., Oppenheim J.J.** Alarmins link neutrophils and dendritic cells // *Trends Immunol.* — 2009. — Vol. 30, №11. — P. 531-537.
122. **Yates C.C., Whaley D., Y-Chen A.** et al. ELR-Negative CXC Chemokine CXCL11 (IP-9/I-TAC) facilitates dermal and epidermal maturation during wound repair // *Am. J. Pathol.* — 2008. — Vol. 173, №3. — P. 643-652.
123. **Yeaman M.R.** Platelets in defense against bacterial pathogens // *Cell Mol. Life Sci.* — 2010. — Vol. 67, №4. — P. 525-544.
124. **Yoshimura A., Suzuki M., Sakaguchi R.** et al. SOCS, Inflammation, and Autoimmunity // *Front. Immunol.* — 2012. — Vol. 20, №3. — P. 1-9.
125. **Zanetti M.** Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity // *J. Leukoc. Biol.* — 2004. — Vol. 75, №1. — P. 39-48.
126. **Zhang X., Mosser D.M.** Macrophage activation by endogenous danger signals // *J. Pathol.* — 2008. — Vol. 214, №2. — P. 161-178.

Поступила 10.04.13

#### Сведения об авторах:

Черешнев Валерий Александрович, д-р мед. наук, проф., акад. РАН, акад. РАМН, дир. ФГБУН «ИИФ» УрО РАН

© Коллектив авторов, 2013  
УДК 616-092.18

С.П. Сергеева<sup>1</sup>, П.Ф. Литвицкий<sup>1</sup>, М.М. Гульяев<sup>2</sup>, А.А. Савин<sup>2</sup>, И.Д. Бреславич<sup>3</sup>

## ***К механизму Fas-индуцированного апоптоза нейронов в патогенезе ишемического инсульта***

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

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119992, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

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

Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, ул. Делегатская, 20/1

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские Горы, 1

*Изучена динамика содержания в плазме крови Fas (CD95), растворимого Fas рецептора (sFas) и растворимого Fas лиганда (sFasL) при ишемическом инсульте (ИИ), корреляция уровней последних с тяжестью неврологических проявлений, установлена роль указанных молекул в механизме Fas-индуцированного апоптоза нейронов при ИИ. Концентрацию sFas, sFasL определяли иммуноферментным методом, экспрессию CD95 на CD3 лимфоцитах — проточной цитометрией. Показано, что Fas-индуцированный апоптоз играет значимую роль в патогенезе ИИ. Уровень sFasL отражает тяжесть состояния пациентов при ИИ. В связи с этим представляется перспективным поиск новых путей коррекции процессов апоптоза в лечении больных ИИ.*

**Ключевые слова:** патогенез ишемического инсульта, апоптоз, sFas, sFasL, Fas, CD95

S.P. Sergeeva, P.F. Litvickiy, M.M. Gulyaev, A.A. Savin, I.D. Breslavich

## ***To the Fas-induced neurons apoptosis mechanisms in stroke pathogenesis***

<sup>1</sup> The First Sechenov Moscow State Medical University, 8-2, Trubetskaya str., Moscow, 119992, Russia

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

<sup>3</sup> Lomonosov Moscow State University, 1-4, Leninskiye Gory, 119991, Russia

*The goal of the present study was to investigate the plasma levels of proteins regulating Fas-induced apoptosis in acute stroke and to relate ones to brain damage and clinical features. By means of ELISA soluble Fas receptor (sFas) and soluble Fas ligand (sFasL) plasma levels were detected. Fas protein (CD95) expression on CD3 lymphocytes surfaces was detected using flow cytometry. It is summarized, that Fas-induced apoptosis play significant role in stroke pathogenesis. As the result, prognostic significance of sFasL plasma level is showed. Fas induced apoptosis mechanisms seems to be perspective target for search new therapy stroke patients.*

**Key words:** stroke pathogenesis, apoptosis, sFas, sFasL, Fas, CD95

Инсульт является одной из главных причин смертности и инвалидизации человека во всех странах мира [2]. В связи с этим необходим поиск надежных методов диагностики, прогноза, лечения, профилактики последствий и реабилитации пациентов после перенесенного инсульта. Успех этой работы в большой мере определяется знанием фундаментальных клеточных и молекулярных звеньев патогенеза инсульта.

Показано, что апоптоз является основным механизмом гибели клеток в перинфарктной зоне [3, 6, 7]. Активации каспаз, в том числе посредством системы FAS с последующим образованием FADD

(FAS ассоциированный с доменом смерти) принадлежит значимая роль в патогенезе инсульта. Ингибирование указанной системы приводит к уменьшению степени поражения нервной ткани у животных после церебральной ишемии в эксперименте [4, 8]. В результате альтернативного сплайсинга, а также отщепления надмембранной части Fas-рецептора (Fas, CD95) или лиганда (FasL, CD178) металлопротеиназами (ММР) образуются растворимые молекулы Fas (соответственно sFas и sFasL), способные регулировать (индуцировать или ингибировать) развитие апоптоза [1, 5].

*Цель исследования* — изучение динамики содержания в крови CD3CD95 лимфоцитов, растворимого Fas рецептора (sFas) и растворимого Fas лиганда (sFasL)

**Для корреспонденции:** Сергеева Светлана Павловна, канд. мед. наук, доцент каф. патофизиологии ГБОУ ВПО ПМГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ. E-mail: svetlanapalna@mail.ru

при ишемическом инсульте (ИИ), корреляции их уровней с тяжестью неврологических проявлений, установление роли указанных молекул в механизме Fas-индуцированного апоптоза нейронов при ИИ.

### Методика

Проведено проспективное одноцентровое контрольно-групповое исследование. Оно не предполагало вмешательства в план диагностических и лечебных мероприятий: все пациенты получали объем медицинской помощи в соответствии со стандартом медицинской помощи больным с инсультом (при оказании специализированной помощи). Исследование соответствовало требованиям Хельсинской Декларации.

Критериями включения в исследование были: впервые развившийся ИИ, установленный клинически и при помощи методов нейровизуализации (КТ, МРТ); критериями исключения: наличие черепно-мозговых травм, транзиторных ишемических атак, рассеянного склероза, онкологических и аутоиммунных заболеваний в анамнезе, аллергических реакций на момент исследования.

Критерии включения в группу контроля: возраст, сопоставимый с группой исследования, отсутствие в анамнезе острых нарушений мозгового кровообращения, черепно-мозговых травм, транзиторных ишемических атак, рассеянного склероза, онкологических и аутоиммунных заболеваний, аллергических реакций на момент исследования.

Для объективизации оценки тяжести состояния, выраженности очагового неврологического дефицита и динамики клинических показателей использовалась балльная шкала инсульта Национального института здоровья (NIHSS). Концентрацию sFas, sFasL определяли на 1-е, 7-е и 21-е сут. после ИИ методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием стандартных тест-систем (Bender Medsystems, Vienna, Austria). Содержание CD95 лимфоцитов определяли методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, France).

Обследовали больных, женщин (средний возраст 75 лет) и мужчин (средний возраст 68 лет), с впервые развившимся ИИ на 1-е, 7-е и 21-е сут. заболевания ( $n=60$ ). Группу контроля составили 25 чел. (средний возраст 72 года) (таблица).

Для анализа фактических данных использовали следующие статистические методы: дисперсионный, корреляционный, регрессионный, кластерный анализ данных. Данные были проверены на нормальность распределения по тесту Шапиро—Уилка. Использовались параметрические ( $t$ -тест Стьюдента) и непараметрические ( $U$ -тест Манна—Уитни) критерии оценки статистической значимости различий. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Достоверной динамики концентрации sFas на 1-е и 7-е сут. не выявлено. Однако на 21-е сут. она была достоверно ниже значения указанного параметра на 7-е сут. исследования (рис. 1). Достоверных отличий от показателей группы контроля ( $83,61 \pm 24,61$  пг/мл) не выявлено на всех сроках исследования. Вместе с тем, в группе пациентов с благоприятным исходом (балл по NIHSS на 21-е сут. ниже 5) отмечена тенденция к увеличению концентрации sFas: на 7-е сут. исследования она была достоверно выше ( $p < 0,05$ ), чем в группе контроля. Учитывая низкий коэффициент корреляции ( $r < 0,01$ ,  $p > 0,05$ ) между sFas и баллом по шкале NIHSS данный параметр предположительно не оказывает значимого влияния на тяжесть и исход ишемического инсульта. Отсутствие достоверной зависимости между значением концентрации sFas на первые сутки и баллом по шкале NIHSS на 21-е сут. говорит об отсутствии прогностической значимости данного параметра.

На всех сроках исследования отмечалась тенденция к росту концентрации sFasL — достоверно она отличалась от группы контроля ( $149,72 \pm 12,06$  нг/мл) на всех сроках исследования и составляла  $197,65 \pm 10,15$ ,  $181,28 \pm 9,2$  и  $210,52 \pm 15,63$  нг/мл на 1-е, 7-е и 21-е сут. соответственно (рис. 2). Высокий положительный коэффициент корреляции ( $r = 0,23$ ,  $p < 0,05$ )

Таблица

Характеристика обследованных пациентов и группы контроля

		Группа контроля	Группа ИИ	Группа ИИ с благоприятным исходом	Группа ИИ с неблагоприятным исходом
<b>Мужчины</b>	Кол-во	12	23	12	11
	Возраст	$69 \pm 7$	$68 \pm 9$	$66 \pm 9$	$70 \pm 7$
<b>Женщины</b>	Кол-во	13	37	23	14
	Возраст	$75 \pm 6$	$75 \pm 8$	$73 \pm 7$	$78 \pm 5$
<b>Всего</b>	Кол-во	25	60	35	25
	Возраст	$72 \pm 10$	$72 \pm 11$	$71 \pm 11$	$74 \pm 12$



между sFasL и баллом по шкале NIHSS указывает на то, что данный параметр отражает тяжесть состояния пациентов с ИИ. Прогностическая значимость указанного параметра, учитывая высокое значение коэффициента корреляции ( $r=0,23$ ) и достоверности этого результата ( $p<0,05$ ), высокая. Возможно, увеличение концентрации sFasL свидетельствует об активации механизмов компенсации в ответ на увеличение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для лейкоцитов. При проникновении через ГЭБ лейкоциты экспрессируют металлопротеиназы (ММП), которые также приводят к демиелинизации и апоптозу олигодендроцитов, регулируют активность нейротрофических факторов, подавляют аксональный рост, отсекают надмембранную часть Fas и FasL, образуя их растворимые формы [5]. Увеличение уровня sFasL приводит к нарастанию масштаба апоптоза лимфоцитов и моноцитов не только в поврежденной ткани головного мозга, но и в крови, а также нейронов и глиальных клеток, на поверхности которых экспрессируется CD95 [8]. В результате этого апоптоз активируется в нервных, а также в глиальных клетках, составляющих ГЭБ. В результате этого проницаемость ГЭБ остается повышенной. Порочный круг замыкается. sFasL образуется также и в результате альтернативного сплайсинга.

При оценке изменения количества субпопуляции лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности CD3CD95 выявлено достоверное их увеличение на 1-е сут. исследования, наиболее выраженное в группе пациентов с неблагоприятным исходом (балл по NIHSS на 21-е сут. выше 5) (рис. 3). Такой результат, наряду с увеличением концентрации sFasL в периферической крови, может быть одной из причин активации апоптоза лимфоцитов и развития лимфопении в течение 1-х сут. ИИ. В группе пациентов с благоприятным исходом заболевания к 7-м и 21-м сут. исследования процентное содержание CD3CD95 лимфоцитов достоверно не отличалось от контрольных значений. Корреляционный анализ показал положительные связи между баллом по шкале NIHSS и указанным параметром. При оценке прогностической значимости достоверного результата не получено, однако этот параметр является прогностически значимым на 7-е сут. исследования (высокая достоверная зависимость между содержанием CD3CD95 лимфоцитов на 7-е сут. и баллом по NIHSS на 21-е).

Таким образом, полученные фактические данные дают основания считать, что Fas-индуцированный апоптоз играет значимую роль в патогенезе ИИ.

Концентрацию sFasL в плазме крови на 1-е сут. после ИИ и содержание CD3CD95-положительных лимфоцитов на 7-е сут. можно считать значимыми параметрами для оценки прогноза состояния пациентов при ИИ.

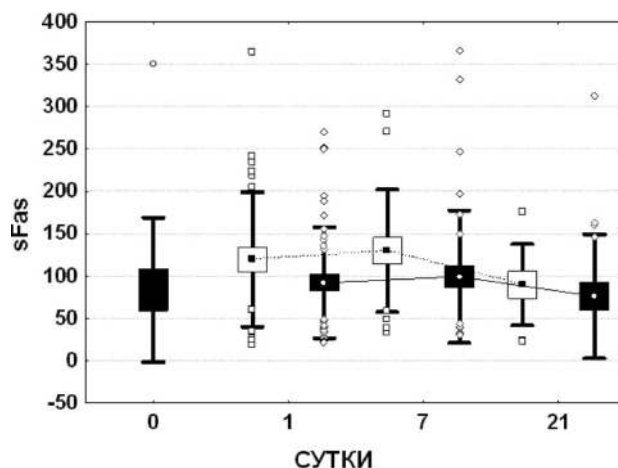


Рис. 1. Концентрация sFasL в крови на 1-е, 7-е, 21-е сут. после ИИ у пациентов в группе с благоприятным исходом (белый), в группе с неблагоприятным исходом (черный) и в группе контроля (К) (пг/мл)

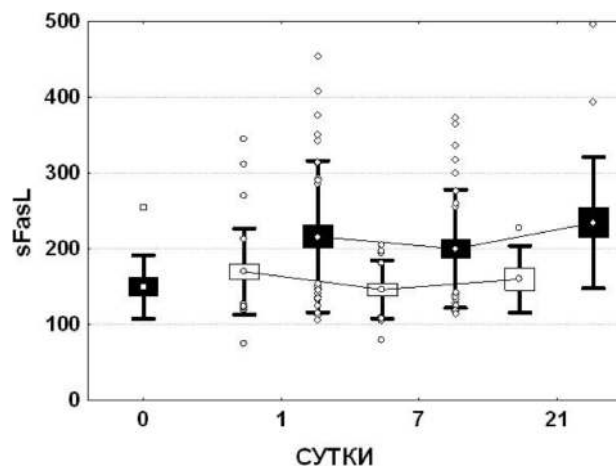


Рис. 2. Концентрация sFasL в крови на 1-е, 7-е, 21-е сут. после ИИ у пациентов в группе с благоприятным исходом (белый), в группе с неблагоприятным исходом (черный) и в группе контроля (К) (пг/мл)

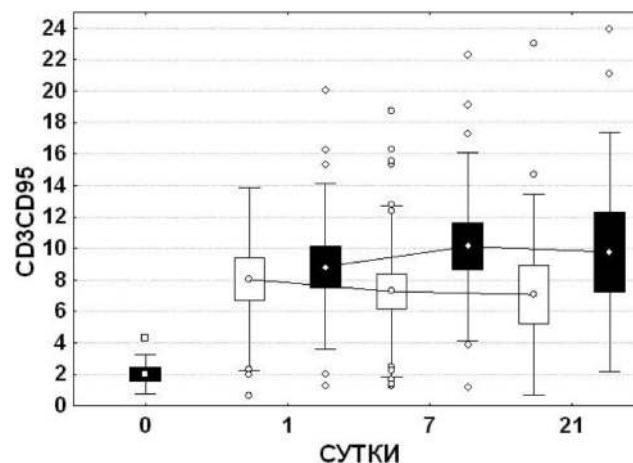


Рис. 3. Содержание CD3CD95 лимфоцитов в крови на 1-е, 7-е, 21-е сут. после ИИ у пациентов в группе с благоприятным исходом (белый), в группе с неблагоприятным исходом (черный) и в группе контроля (К) (%)

Концентрация sFasL отражает тяжесть состояния пациентов. С учетом указанных фактов представляется перспективным поиск путей воздействия на механизмы Fas-индуцированного апоптоза в диагностике, оценке прогноза и эффективности лечения пациентов с ИИ.

### Список литературы

1. *Hoke M., Schillinger M., Zorn G.* et al. The prognostic impact of soluble apoptosis-stimulating fragment on mortality in patients with carotid atherosclerosis // *Stroke*. — 2011. — №42. — P. 2465-2470.
2. *Mathers C.D., Boerma T., Ma Fat D.* Global and regional causes of death // *British medical bulletin*. — 2009. — №92. — P. 7-32.
3. *Morillas P., Andrade H., Castillo J.* et al. Inflammation and apoptosis in hypertension. Relevance of the extent of target organ damage // *Revista Española de Cardiología (English Edition)*. — 2012. — Vol. 65, №9. — P. 819-825.
4. *Niua F., Zhang X., Hue X.* et al. Targeted mutation of Fas ligand gene attenuates brain inflammation in experimen-

tal stroke // *Brain, Behavior, and Immunity*. — 2012. — Vol. 26, №1. — P. 61-71.

5. *Ramos-Fernandez M., Bellolio M.F., Stead L.G.* Matrix metalloproteinase-9 as a marker for acute ischemic stroke: asystematic review // *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. — 2011. — Vol. 20, №1. — P. 47-54.

6. *Saino O., Taguchi A., Nakagomi T.* et al. Immunodeficiency reduces neural stem/progenitor cell apoptosis and enhances neurogenesis in the cerebral cortex after stroke // *Journal of Neuroscience Research*. — 2010. — Vol. 88, №11. — P. 2385-2397.

7. *Sairanen T., Karjalainen-Lindsberg M.L., Paetau A.* et al. Apoptosis dominant in the periinfarct area of human ischaemic stroke — a possible target of antiapoptotic treatment // *Brain*. — 2006. — №129. — P. 189-199.

8. *Strasser A., Jost P.J., Nagata S.* The many roles of FAS receptor signaling in the immune system // *Immunity*. — 2009. — №30. — P. 180-192.

Поступила 26.02.13

### Сведения об авторах:

*Литвицкий Петр Францевич*, д-р мед. наук, зав. каф. патофизиологии ГБОУ ВПО ПМГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ

*Гультяев Максим Михайлович*, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. патогенеза и методов лечения инфекционных заболеваний ГБОУ ВПО МГМСУ им. Евдокимова Минздрава РФ

*Савин Алексей Алексеевич*, д-р мед. наук, проф. каф. нервных болезней ГБОУ ВПО МГМСУ им. Евдокимова Минздрава РФ

*Бреславич Илья Дмитриевич*, соискатель, механико-математический факультет ФГБОУ ВПО МГУ им. М.В. Ломоносова

Ф.М. Шакова<sup>1</sup>, П. Клодт<sup>2</sup>, В.С. Кудрин<sup>2</sup>, Т.В. Давыдова<sup>1</sup>, Г.А. Романова<sup>1</sup>

## **Защитная роль антител к глутамату при очаговом ишемическом повреждении префронтальной коры мозга крыс**

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

*На модели двустороннего фототромбоза сосудов префронтальной коры головного мозга крыс показано, что антитела к глутамату при их интраназальном введении через 1 ч после ишемического повреждения коры способствуют снижению содержания глутамата в префронтальной коре и гиппокампе.*

**Ключевые слова:** антитела к глутамату, глутамат, нейромедиаторные аминокислоты, фототромбоз, префронтальная кора мозга, гиппокамп, гипоталамус

F.M. Shakova<sup>1</sup>, P. Klodt<sup>2</sup>, V.S. Kudrin<sup>2</sup>, T.V. Davydova<sup>1</sup>, G.A. Romanova<sup>1</sup>

## **The saving role of glutamate antibodies with the acute ischemic damage of the rat brain prefrontal cortex**

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

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

*On the model of acute ischemic damage of prefrontal areas of the rats brain cortex was shown, that intranasal injection of glutamate antibodies over one hour after ischemic damage of brain prefrontal areas leads to diminishing of glutamate content in hippocampus and prefrontal cortex.*

**Key words:** antibodies to glutamate, glutamate, neuromediator aminoacids, photothrombosis, prefrontal cortex of brain, hippocampus, hypothalamus

Известно, что одним из ключевых механизмов при ишемических и травматических повреждениях мозга является нарушение глутаматергической нейротрансмиссии в головном мозге. Глутамат является основным возбуждающим нейротрансмиттером в ЦНС, участвующим во многих процессах в мозге, включая когнитивные функции. Ведущая роль при осуществлении процессов обучения и памяти принадлежит префронтальной коре и гиппокампу [4]. Избыточная активация глутаматергической системы при ишемических повреждениях мозга оказывает нейротоксическое действие, обуславливая из-за длительного притока кальция, гибель кортикальных и субкортикальных нейронов [8]. Помимо глутамата в первоначальный период церебральной ишемии важную роль играет тормозный медиатор ГАМК, который выполняет протективную функцию. Показано, что нарушение соотношения глутамат/ГАМК в первые 30 мин. в пользу глутамата является триггерным механизмом повреждения коры головного мозга [8]. Ранее было показано усиленное образование аутоантител к глутамату (АТ-ГЛ) у крыс с двусторонним ишемическим повреждением пре-

фронтальной области коры головного мозга к 8-м суткам после операции [3]. Показано также, что АТ-ГЛ при интраназальном введении через час после операции двустороннего фотохимического тромбоза сосудов префронтальной коры способствуют сохранению условного рефлекса пассивного избегания, выработанного до повреждения коры у крыс [3]. Одним из механизмов протективного действия Глу-АТ при ишемическом повреждении мозга, может быть их способность снижать усиленную продукцию глутамата.

В связи с этим *целью настоящей работы* было изучение влияния АТ-ГЛ на содержание возбуждающих аминокислот (глутамата, аспартата), а также тормозной аминокислоты ГАМК в структурах мозга крыс (префронтальная кора, гиппокамп, гипоталамус), связанных с когнитивными функциями, в первые и восьмые сутки после ишемического повреждения префронтальной области коры.

### **Методика**

Работа выполнена на 48 беспородных крысах-самцах массой 200—220 г, выращенных в виварии НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН. Животные содержались в виварии при свободном доступе к пище, воде и 12-часовом световом режиме.

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

При работе с крысами соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований.

Все взятые в эксперимент животные были разделены на две серии: I — первые сутки и II — восьмые сутки после фототромбоза по 4 группы в каждой:

1-я группа (n=6) — ложнопериорированные;

2-я группа (n=6) — крысы с двусторонним ишемическим инфарктом префронтальной коры головного мозга, которым через час после операции вводили интраназально по 7 мкл физиологического раствора;

3-я группа (n=6) — крысы, которым по той же схеме вводили интраназально водный раствор АТ-ГЛ в дозе 250 мкг/кг;

4-я группа (n=6) — животные, которым в качестве контроля вводили водный раствор кроличьего  $\gamma$ -глобулина от интактных животных по той же схеме и в той же дозе.

АТ-ГЛ получали от кроликов, иммунизированных по стандартной схеме конъюгатом глутамат-бычий сывороточный альбумин (БСА), синтезированным модифицированным методом с помощью бифункционального реагента глутаральдегида [7]. Титр АТ-ГЛ, определяемый методом иммуноферментного анализа (ИФА), составил 1:1000.  $\gamma$ -Глобулиновые фракции из сывороток иммунизированных и интактных кроликов выделяли методом переосаждения сульфатом аммония, очищали от БСА методом аффинной хроматографии, лиофилизировали и хранили при 4°C.

Двусторонний фокальный ишемический инфаркт префронтальной коры головного мозга крыс — поля F1 и F2 [6] создавали методом фотохимически индуцируемого тромбоза [9]. Операцию проводили под общим наркозом, вызываемым внутрибрюшинным введением хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг. После введения фотосенсибилизирующего красителя бенгальского розового («Sigma», USA; 40 мг/кг, внутривенно) крысу фиксировали в стереотаксисе, делали продольный разрез кожи и удаляли надкостницу. Для облучения использовали специальную установку, состоящую из источника холодного света с галогеновой лампой мощностью 250 Вт, и световода с диаметром внутреннего сечения 3 мм. Световод устанавливали на расстоянии 1 мм от поверхности черепа на 2 мм роstralнее брегмы и на 2 мм латеральнее сагиттального шва и облучали холодным светом каждое из полушарий мозга в течение 15 мин. Ложнопериорированных животных подвергали тем же процедурам, за исключением введения красителя бенгальского розового.

Определение содержания глутамата, аспартата и ГАМК-нейромедиаторных аминокислот проводили в структурах мозга (префронтальной коре, гиппокампе и гипоталамусе) на 1-е и 8-е сутки после операции методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с

электрохимической детекцией согласно стандартной методике [5]. Поскольку аминокислоты в нативной форме являются очень слабыми хромофорами (не поглощаются УФ спектром) и не проявляют электрохимической активности, для их детекции необходимо предварительное проведение химического модифицирования — дериватизации. Для этого использовали ортафталевоый альдегид (ОФА), способный флуоресцировать при связывании с аминокислотой.

Аспартат, глутамат, и ГАМК в концентрации 0,1 мкМ/мл в 0,1 н. HClO<sub>4</sub> использовали в качестве стандартной смеси для калибровки. Через 15 мин. после инкубации при комнатной температуре 20 мкл раствора наносили на колонку Agilent Hypersil ODS 5 мкМ, 4,6x250. Регистрацию продуктов разделения проводили на флуоресцентном детекторе Agilent 1100 (USA) при длине волны возбуждения 230 нм и волны эмиссии 392 нм. Мобильная фаза состояла из 0,05 М фосфатного буфера (рН 5,6) с 0,025 мМ ЭДТА и 5% ацетонитрила. Скорость подвижной фазы составляла 1,5 мл/мин.

Подвижную фазу фильтровали с помощью вакуумного насоса через целлюлозный фильтр (диаметр пор — 0,02 мкм) и перед каждым хроматографическим определением тщательно дегазировали под вакуумом.

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы Statistica 6.0 с использованием однофакторного непараметрического дисперсионного анализа по Kruskal—Wallis с последующим внутригрупповым сравнением по U критерию Mann—Whitney.

## Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований были выявлены существенные различия в содержании глутамата в префронтальной коре головного мозга у исследуемых групп крыс на 1-е и 8-е сутки после операции двустороннего фототромбоза сосудов префронтальной коры  $H(3, N=24)=8,88659, p=0,0308$ ;  $H(3, N=24)=14,98333, p=0,0018$  соответственно.

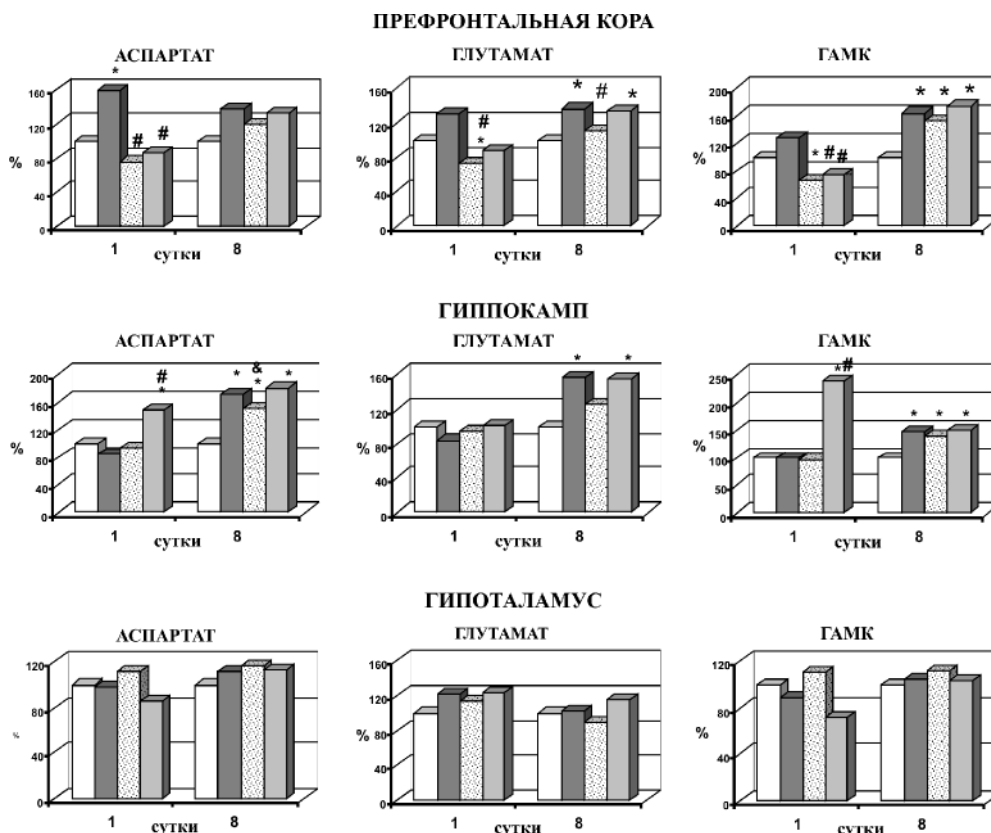
Как видно из рисунка, интраназальное введение АТ-ГЛ через час после ишемического повреждения префронтальной коры головного мозга приводило к выраженному снижению содержания глутамата в префронтальной коре как в 1-е, так и на 8-е сутки наблюдения. Интраназальное введение  $\gamma$ -глобулина от интактных кроликов через час после операции не оказывало существенного влияния на содержание глутамата в префронтальной коре по сравнению с группой крыс с очаговым ишемическим повреждением этой структуры головного мозга.

В префронтальной коре головного мозга выявлены различия в уровнях аспартата в опытных группах животных в 1-е сутки после операции двустороннего фототромбоза сосудов префронтальной коры  $H(3, N=24)=12,64266, p=0,0055$  (рисунок). Так, наблюдалось выраженное повы-

шение содержания аспартата у крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры по сравнению с ложнооперированными животными в этот срок наблюдения. В это же время интраназальное введение через час после операции как АТ-ГЛ, так и  $\gamma$ -глобулина приводило к существенному снижению уровня аспартата у животных с ишемическим повреждением префронтальной коры головного мозга.

Как видно из рисунка, в 1-е сутки интраназальное введение животным АТ-ГЛ или  $\gamma$ -глобулина через час после операции приводило к выраженному снижению содержания ГАМК в префронтальной коре головного мозга ( $H(3, N=24)=10,25558, p=0,0165$ ). На 8-е сутки после операции двустороннего фотохимического фототромбоза сосудов префронтальной коры было отмечено существенное увеличение уровня ГАМК в группах с ишемическим повреждением префронтальной коры, с ишемическим повреждением префронтальной коры и интраназальным введением АТ-ГЛ или  $\gamma$ -глобулина интактных кроликов ( $H(3, N=24)=11,60360, p=0,089$ ).

В гиппокампе на 8-е сутки после операции двустороннего фототромбоза сосудов префронтальной коры были выявлены основные изменения в содержании возбуждающих аминокислот среди исследуемых групп животных: глутамата —  $H(3, N=24)=8,987297, p=0,0295$ , и аспартата  $H(3, N=24)=14,26712, p=0,0026$ . Так, уровень глутамата был повышен в группе крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры и в группе крыс с таким же повреждением коры и интраназальным введением  $\gamma$ -глобулина по сравнению с группой ложнооперированных животных. Группа животных с ишемическим повреждением префронтальной коры, получавшая интраназально АТ-ГЛ, по содержанию глутамата в гиппокампе не отличалась от контрольной группы ложнооперированных крыс. Уровень аспартата в гиппокампе был повышен во всех опытных группах по сравнению с контрольной группой ложнооперированных животных. Однако уровень аспартата в гиппокампе у крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры, получавших



По оси абсцисс обозначены сутки после двустороннего фототромбоза префронтальной коры головного мозга крыс; по оси ординат показано содержание возбуждающих и тормозных аминокислот в префронтальной коре крыс в процентах. Содержание аминокислот в контрольной группе ложнооперированных крыс принято за 100%.

Белые столбики — ложнооперированные животные +0,9% NaCl, темно-серые столбики — крысы с ишемическим повреждением префронтальной коры + 0,9% NaCl, заштрихованные столбики — крысы с ишемическим повреждением префронтальной коры + АТ-Глу 250 мкг/кг, светло-серые столбики — крысы с ишемическим повреждением префронтальной коры + гамма-глобулин от интактных кроликов 250 мкг/кг.

Постдисперсионный анализ по непарному критерию Манна—Уитни. Число животных в группах по 6.  $P<0,05$ : \* — по сравнению с группой ложнооперированных крыс; # — по сравнению с группой крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры, & — по сравнению с группой крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры, получавших гамма-глобулин от интактных кроликов.

интраназально АТ-ГЛ, был ниже, чем у крыс, получавших интраназально  $\gamma$ -глобулин интактных кроликов. В отношении содержания ГАМК в гиппокампе у всех трех опытных групп было отмечено его повышение по сравнению с контрольной группой ложнопериорированных крыс ( $H(3, N=24)=14,44306, p=0,0024$ ).

Во все периоды наблюдения содержание аспартата, глутамата и ГАМК в гипоталамусе в исследуемых группах существенно не различалось (1 сутки аспартат —  $H(3, N=24)=5,042629, p=0,1687$ ; глутамат —  $H(3, N=24)=3,259251, p=0,3534$ ; ГАМК  $H(3, N=24)=5,656504, p=0,1296$ ; 8 сутки аспартат —  $H(3, N=24)=2,091685, p=0,5536$ ; глутамат —  $H(3, N=24)=3,321776, p=0,3446$ ; ГАМК —  $H(3, N=24)=0,8172419, p=0,8453$ ).

Можно заключить, что в результате проведенных экспериментов получены данные, свидетельствующие о специфическом защитном влиянии АТ-ГЛ на уровень глутамата в префронтальной коре и гиппокампе у крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры головного мозга как на 1-е, так и на 8-е сутки после операции двустороннего фототромбоза сосудов префронтальной коры.

В гиппокампе увеличение глутамата выявляется только на 8-е сутки наблюдения у крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры и защитный эффект интраназального введения АТ-ГЛ также отмечен в этот срок наблюдения. В 1-е сутки после операции выявлены неспецифические защитные эффекты интраназального введения как АТ-ГЛ, так и  $\gamma$ -глобулина интактных кроликов на содержание аспартата в префронтальной коре крыс при её ишемическом повреждении. В отношении содержания ГАМК у животных с фототромбозом префронтальной коры также выявлены неспецифические эффекты АТ-ГЛ. Интраназальное введение как АТ-ГЛ, так и  $\gamma$ -глобулина вызывает снижение содержания ГАМК в 1-е сутки наблюдения у животных с ишемическим повреждением префронтальной коры головного мозга.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов установлено нормализующее действие АТ-ГЛ на содержание возбуждающей нейротрансмиттерной аминокислоты — глутамата у животных с очаговым ишемическим повреждением префронтальной коры мозга. Ранее показано увеличение содержания возбуждающих аминокислот (аспартата и глутамата) при ишемическом повреждении коры головного мозга [2]. Интраназальное введение АТ-ГЛ через час после операции приводило к снижению содержания глутамата в префронтальной коре и гиппокампе как в 1-е, так и на 8-е сутки после фототромбоза, что свидетельствует о специфическом действии АТ-ГЛ на усиленную продукцию глутамата. Полученные данные позволяют объяснить ранее полученные про-тективные эффекты АТ-ГЛ при остром нейродегенеративном повреждении когнитивных функций мозга [3]: значительное антигемнестическое действие интраназального введения АТ-ГЛ при ишемическом повреждении префронтальной коры головного мозга.

кислот (аспартата и глутамата) при ишемическом повреждении коры головного мозга [2]. Интраназальное введение АТ-ГЛ через час после операции приводило к снижению содержания глутамата в префронтальной коре и гиппокампе как в 1-е, так и на 8-е сутки после фототромбоза, что свидетельствует о специфическом действии АТ-ГЛ на усиленную продукцию глутамата. Полученные данные позволяют объяснить ранее полученные про-тективные эффекты АТ-ГЛ при остром нейродегенеративном повреждении когнитивных функций мозга [3]: значительное антигемнестическое действие интраназального введения АТ-ГЛ при ишемическом повреждении префронтальной коры головного мозга.

### Список литературы

1. *Гусев Е.И., Скворцова В.И.* Ишемия головного мозга. — М., 2001. — С. 328.
2. *Романова Г.А.* Дизрегуляторные нарушения интегративной деятельности мозга при фокальной ишемии коры // *Дизрегуляторная патология* / Под ред. Г.Н. Крыжановского. М., 2002. — С. 605-615.
3. *Романова Г.А., Шакова Ф.М., Горбатов В.Ю.* и др. Влияние антител к глутамату на сохранение условного рефлекса пассивного избегания у крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры мозга // *БЭБ и М.* — 2010. — Т. 149, №3. — С. 261-264.
4. *Kolb B.* Functions of the frontal cortex of the rat: comparative review // *Brain Res.* — 1984. — Vol. 320, №1. — P. 65-98.
5. *Pearson S.J., Crudek C., Mercer K.* et al. Electrochemical detection of human brain transmitter amino acids by high-performance liquid chromatography of stable o-phthalaldehyde-sulphite derivatives // *J. Neural Transm.* — 1991. — Vol. 86. — P. 151-157.
6. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* 3<sup>rd</sup> ed. / Paxinos G., Watson C. — San Diego, 1997.
7. *Seguela P., Geffard M., Buijs R., Le Moal M.* Antibodies against gamma-aminobutyric acid: specificity studies and immunochemical results. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1984. — Vol. 81, №12. — P. 3888-3892.
8. *Wang X., Shimizu-Sasamata M., Moskowitz M.A.* et al. Profiles of glutamate and GABA efflux in core versus peripheral zones of focal cerebral ischemia in mice. // *Neurosci. Lett.* — 2001. — Vol. 313, №3. — P. 121-124.
9. *Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R.* et al. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis // *Ann. Neurol.* — 1985. — Vol. 17, №5. — P. 497-504.

Поступила 15.04.13

### Сведения об авторах:

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

*Клодт Петр Михайлович*, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. нейрхимической фармакологии ФГБУ НИИФ РАМН

*Владимир Сергеевич Кудрин*, канд. мед. наук, зав. лаб. нейрхимической фармакологии ФГБУ НИИФ РАМН

*Давыдова Татьяна Викторовна*, д-р мед. наук, главн. науч. сотр. лаб. нейроиммунопатологии ФГБУ НИИОПП РАМН

Н.Я. Коваленко, Д.Д. Мацевский, В.К. Решетняк

## Роль М4-подтипа холинорецепторов в ацетилхолиновой вазоконстрикции у крыс

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

В опытах на крысах с использованием высокочастотной УЗ измерительной техники и селективного блокатора М4-подтипа холинорецепторов тропикамида показано, что введение животным внутривенно данного мускаринового антагониста в дозах, превышающих порог селективности препарата (1 мг/кг), приводит к выраженному угнетению системного кровообращения. У животных развиваются выраженная транзиторная гипотензия и брадикардия, снижается общее периферическое сосудистое сопротивление и минутный объем сердца. Выключение М4-холинорецепторов тропикамидом в дозах 0,1—0,001 мг/кг оказывает транзиторное, дозозависимое, и разнонаправленное действие на гемодинамические показатели — уменьшаются АД, общее периферическое сосудистое сопротивление, частота сердечных сокращений, минутный объем сердца, в то же время скорость аортального кровотока и величина ударного объема сердца увеличиваются. При дальнейшем снижении дозы тропикамида (0,0001 мг/кг) практически не выявляется его отрицательный хронотропный эффект в то время, как сосудистое действие препарата (снижение АД и общего периферического сосудистого сопротивления) сохраняется. Полученные данные обсуждаются в аспекте возможного участия М4-подтипа холинорецепторов в ацетилхолиновой вазоконстрикции.

**Ключевые слова:** М-4 холинорецепторы, тропикамид, сосуды, ацетилхолиновая вазоконстрикция, ультразвук

N.Ya. Kovalenko, D.D. Matsievsky, V.K. Reshetnyak

## The role of M4-subtype of cholinergic receptors in acetylcholine vasoconstriction

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

In experiments on rats using high frequency ultrasonic measurement technique and selective M4-cholinergic receptor antagonist tropicamide it was shown that i/v injection of the cholinergic block agent in large doses exceeding of its selective threshold (1 mg/kg) causes pronounced inhibition of the cardiovascular system in rats. Severe transitory hypotension and bradycardia are developed, general vascular resistance, minute cardiac output, are decreased. The block of M4-cholinergic receptors with smaller doses of tropicamide (0,1—0,001 mg/kg) causes transitory dose-dependent effect on hemodynamic — system blood pressure and vascular resistance, pulse, minute cardiac output, as soon as velocity of aortic blood flow, stroke cardiac output are increased on the contrary. The following decrease the dose of the high selective M4-cholinergic antagonist (0,0001 mg/kg) reveals that its negative chronotropic effect are not detected practically but tropicamide vessel action (decrease of system blood pressure and vascular resistance) are preserved distinctly. The obtained data are discussed in aspect of the possible involvement of M4-muscarinic receptor subtype in acetylcholine-induced vasoconstriction in rats.

**Key words:** M4-cholinergic receptors, tropicamide, vessels, acetylcholine vasoconstriction, ultrasonic

Как известно, периферические сосуды не получают парасимпатическую иннервацию за исключением определенных сосудистых областей. В то же время ацетилхолин и другие мускариновые агонисты вызывают генерализованное расширение сосудов и снижение системного артериального давления (АД) [7, 13]. Вазодилататорное действие ацетилхолина связывают с активации М3 — подтипа мускариновых холинорецепторов (М-ХР), находящихся в эндотелии, что

приводит к образованию оксида азота (NO), накоплению cGMP и релаксации гладких мышц сосудов. В литературе описаны также вазоконстрикторные эффекты ацетилхолина. Следует сказать, что если вопрос об NO-зависимой ацетилхолиновой вазодилатации к настоящему времени достаточно хорошо изучен, то о вазоконстрикторном влиянии ацетилхолина известно немного. Имеющиеся в литературе сведения ограничены и неоднозначны. Весьма противоречивы наблюдения о том, с каким, из известных на сегодня 5 подтипов М-ХР [9, 11, 12], связана не-нейрональная ацетилхолиновая вазоконстрикция. Так, по дан-

Для корреспонденции: Коваленко Наталья Яковлевна, канд. мед. наук, старш. науч. сотр. лаб. комбинированных повреждений и шока ФГБУ НИИОПП РАМН. E-mail: niiopp@mail.ru

ным одних авторов, в гладких мышцах сосудов *in vitro* выявляются МЗ-ХР, которые вызывают вазоконстрикцию, усиливающуюся при удалении эндотелия или его повреждении [10]. По результатам других исследователей, в ацетилхолиновом сокращении сосудистой стенки *in vitro* участвуют такие подтипы М-ХР, как М1-ХР и М2-ХР [7, 9], которые характеризуются наличием органной и видовой специфичности [10]. Роль М4-подтипа ХР в развитии ненейрональной вазоконстрикции и регуляции сосудистого тонуса остается неясной и недостаточно изученной.

**Цель исследования** — изучение дозозависимого действия высокоизбирательного блокатора М4-ХР тропикамида на общее периферическое сосудистое сопротивление (ОПСС), АД и насосную функцию сердца интактных крыс.

### Методика

Опыты выполнены на 34 крысах-самцах Вистар массой 250—280 г под уретановым наркозом (1,25 г/кг в/б). В ходе эксперимента у всех животных регистрировали микроманометром АД в бедренной артерии. Скорость кровотока в восходящей части дуги аорты определяли без вскрытия грудной клетки с помощью вводимого через сонную артерию УЗ катетера диамет-

ром 0,6 мм. В качестве чувствительного элемента датчика применяли миниатюрные пьезокристаллы, работающие на частоте 26,8 МГц. Используя специальное электронное устройство, изучали динамику ударного (УО) и минутного (МО) объемов сердца, а также ОПСС. Частоту сердечных сокращений (ЧСС) определяли, применяя кардиотахометр, запускаемый от пульсовой волны аортального кровотока [2—4]. В качестве селективного блокатора М4-ХР использовали тропикамид («Sigma»), который вводили внутривенно в дозе 1—0,0001 мг/кг массы тела животного. Максимальное время наблюдения за действием тропикамида составляло 60 мин после введения препарата. Для обработки полученных данных использовали метод Фишера—Стьюдента. Достоверность различия оценивали с помощью *t* критерия Стьюдента при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Тропикамид, вводимый интактным крысам в/в в больших дозах (1 мг/кг) оказывал выраженный транзиторийный гипотензивный эффект и вызывал сильную брадикардию. Уже через 1—2 с после введения М-холинблокатора наблюдалось быстрое снижение АД до 20—25 мм рт. ст., кратковременное увеличение на 25—30%, а затем снижение ОПСС на 70—80% от

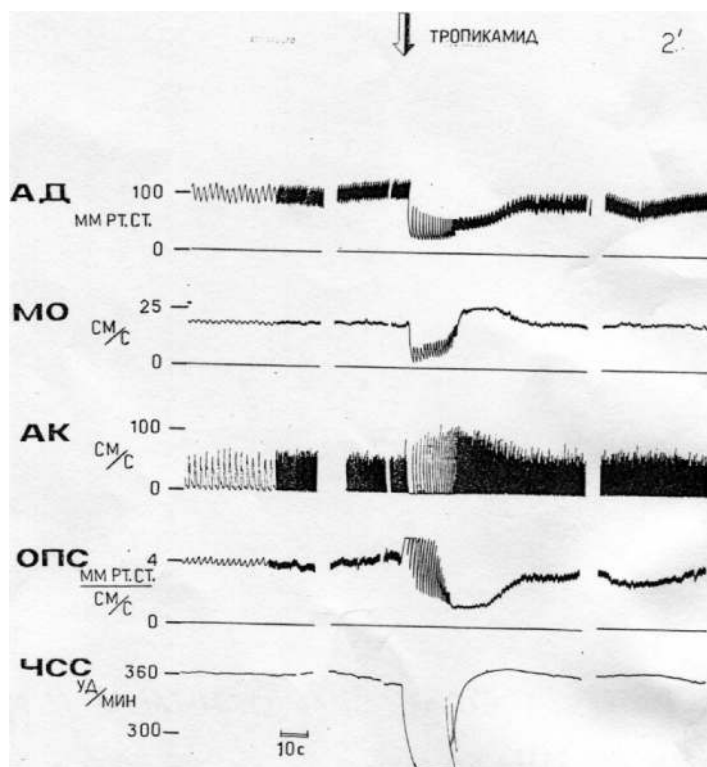


Рис. 1. Влияние тропикамида в дозе 1 мг/кг в/в на показатели дыхания и системного кровообращения интактной крысы (оригинальные кривые). Здесь и на рис. 3 сверху вниз: АД — системное артериальное давление; МО — минутный объем крови; АК — линейная скорость кровотока в восходящей дуге аорты; ОПС — общее периферическое сосудистое сопротивление; ЧСС — частота сердечных сокращений; слева направо сверху: стрелка — введение препарата; время после введения препарата (мин)



исходного уровня (рис. 1). Скорость аортального кровотока и величина УО сердца транзитивно возрастали более, чем вдвое. Изменения МО сердца и ЧСС носили двуфазный характер. После первоначального быстрого снижения этих показателей на 80—90% наблюдалось их восстановление с последующим небольшим увеличением на 15—20%. Через 3—4 мин после введения холиноблокатора наступала нормализация всех изученных гемодинамических показателей.

Действие тропикамида в дозах 0,1—0,001 мг/кг на центральное кровообращение было дозозависимым и разнонаправленным — угнетающим на АД, ЧСС и стимулирующим на насосную функцию сердца (рис. 2). Введение селективного холинолитика в дозе 0,1 мг/кг приводило к снижению на 60—70% от исходного уровня АД, ОПСС, а также ЧСС. МО сердца уменьшался на 15—20%, скорость аортального кровотока и величина УО сердца при этом увеличивались на 25—30%. Через 30—40 с наступала нормализация указанных гемодинамических параметров. Дальнейшее снижение дозы М4-холиноблокатора приводило к уменьшению величины описанных выше изменений изученных показателей. Так при введении тропикамида в дозе 0,01 мг/кг АД и ОПСС снижались примерно на половину (рис. 2, 3). Отрицательный хронотропный эффект был выражен незначительно, изменения со стороны СВ носили непостоянный характер. У части животных (35% случаев) наблюдалось небольшое (на 10—15%), но стойкое увеличение скорости аортального кровотока, а также УО и

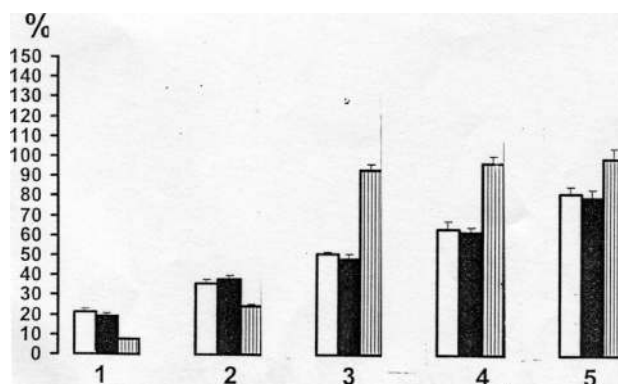


Рис. 2. Дозозависимое действие тропикамида на артериальное давление, общее периферическое сосудистое сопротивление и ЧСС у крыс.

Светлые столбики — АД; темные — ОПСС; с вертикальной штриховкой — ЧСС; по оси абсцисс — доза препарата: 1 — 1 мг/кг; 2 — 0,1 мг/кг; 3 — 0,01 мг/кг; 4 — 0,001 мг/кг; 5 — 0,0001 мг/кг; по оси ординат — максимальные изменения показателей после введения тропикамида (% от исходного уровня, принимаемого за 100%)

МО сердца, у других животных показатели СВ не изменялись. При снижении вводимой дозы тропикамида еще на порядок (0,001 мг/кг) его отрицательный хронотропный эффект практически не выявлялся в то время, как действие на АД и ОПСС сохранялось (рис. 2). При еще больших разведениях препарата (0,0001 мг/кг) регистрировалось его действие только на сосуды — АД и ОПСС снижались 20—25%. Влияния на ЧСС, а также показатели СВ тропикамид в таких дозировках не оказывал.

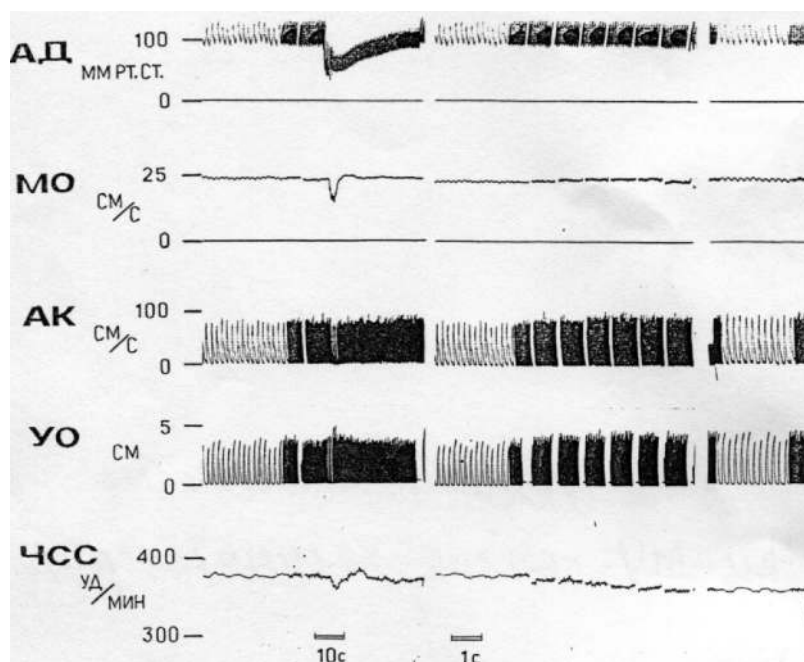


Рис. 3. Изменения показателей системной гемодинамики у интактной крысы после в/в введения тропикамида в дозе 0,01 мг/кг. УО — ударный объем сердца. Время наблюдения за действием холиноблокатора 60 мин (оригинальные кривые)

Таким образом, блокада *in vivo* М4-ХР высокоизбирательным антагонистом тропикамидом приводит к транзиторному дозозависимому снижению АД, ОПСС, ЧСС и уменьшению МО сердца из-за развивающейся брадикардии. Насосная функция сердца при этом увеличивается. Обращает на себя внимание неодинаковая чувствительность сердца и сосудов к дозозависимому действию изученного селективного холинолитика. Так, по мере снижения дозы тропикамида уменьшается его отрицательный хронотропный эффект. При введении холиноблокатора в дозе 0,001 мг/кг снижение ЧСС практически не отмечается. В то же время, гипотензивное действие данного холинолитика, связанное с расширением сосудов и снижением ОПСС, сохраняется при его введении в таких концентрациях, как 0,0001 мг/кг, что дает основание говорить о высокой селективности М4-ХР сосудистой стенки.

Полученные нами данные о действии тропикамида на АД и ОПСС, являющегося интегративным показателем состояния сосудистой резистивности, дают основания полагать, что у крыс вазоконстрикторные эффекты ацетилхолина *in vivo* могут быть связаны с активацией М4-подтипа ХР, локализующихся периферически, непосредственно в сосудистой стенке. Однако нельзя исключить и то, что тропикамид при его введении в системную циркуляцию мог проникать через гематоэнцефалический барьер [6] и оказывать действие на соответствующие холинергические структуры головного мозга, принимающие участие в центральной регуляции сосудистого тонуса [5]. В этом плане весьма интересным было бы проведение экспериментов по сравнительному изучению *in vivo* влияния высокоселективных агонистов и антагонистов М4-ХР на сердечно-сосудистую систему в норме при введении селективных холиномиметиков и холинолитиков внутривенно и интратистернально.

Все вышесказанное, а также данные, полученные нами ранее, свидетельствуют об участии М4-ХР в регуляции сердечно-сосудистой системы в норме и о наличии функциональной гетерогенности различных подтипов М-ХР при осуществлении ими холинергической регуляции в условиях целостного организма [1].

## Список литературы

1. Коваленко Н.Я., Мацневский Д.Д. Селективная блокада М1-холинорецепторов головного мозга пирензепином ухудшает состояние систем кровообращения и дыхания у крыс с острой кровопотерей // Бюл. exper. биол. — 2006. — Т. 142, №9. — С. 255-259.
2. Мацневский Д.Д. Внутрисосудистые измерения кровотока на крысах // Бюл. exper. биол. 1993. Т.116, №8. — С. 144-147.
3. Мацневский Д.Д. Ультразвук в экспериментальных исследованиях макро- и микроциркуляции // Бюл. exper. биол. — 2003. — Т. 136, №7. — С. 115-118.
4. Мацневский Д.Д. Измерения кровотока в исследованиях макро- и микроциркуляции // Бюл. exper. биол. — 2004. — Т. 137, №10. — С. 612-616.
5. Подосиновичева Н.П., Горобец Л.Ф., Долго-Сабуров В.Б. Типовая принадлежность пресинаптических М-холинорецепторов различных отделов мозга крыс // Бюл. exper. биол. — 1996. — Т. 122, №7. — С. 75-77.
6. Betz A.I., McLaughlin P.I., Burgos M. et al. The muscarinic receptors antagonist tropicamide suppresses tremulous jaw movement in a rodent model of parkinsonian tremor: possible role of M4- receptors // Psychopharm. — 2007. — Vol. 194, №3. — P. 347-359.
7. Broadly R.J., Kelly D.P. Muscarinic receptors agonist and antagonist // Molecules. — 2001. — №6. — P. 142-193.
8. Caulfield M.P., Birdsall N.J.M. International Union of Pharmacology. XVII Classification of Muscarinic acetylcholine receptors // Pharm. Rev. — 1998. — Vol. 50, №2. — P. 279-290.
9. Jaiswal N., Lambrecht F.J., Mutschler E. et al. Pharmacological characterization of vascular muscarinic receptors mediating relaxation and contraction in rabbit aorta // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 1991. — Vol. 258, №3. — P. 848-850.
10. Leris V.A., Hita F.J., Gobbi M.D. Relaxation and contraction in rabbit aorta Pharmacological characterization of the muscarinic receptors subtypes mediating vasoconstriction of human umbilical vein // Br. J. Pharmacol. — 2006. — Vol. 147, №5. — P. 516-523.
11. Steinle J.J., Smith P.G. Presynaptic muscarinic facilitation of parasympathetic neurotransmission after sympathectomy in rats // J. Pharm. Exp. Ther. — 2000. — Vol. 294, №2. — P. 627-632.
12. Zhang H.M., Chen S.P., Matsui M. et al. Opposite function of spinal M2, M3, M4 receptors subtypes in regulation of GABAergic inputs to dorsal neuron revealed by muscarinic receptors knockout mice // Mol. Pharmacol. — 2006. — Vol. 69, №3. — P. 1048-1055.
13. Wess J. Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors // Crit. Rev. Neurobiol. — 1966. — Vol. 10, №2. — P. 69-99.

Поступила 21.05.13

## Сведения об авторах:

Коваленко Наталья Яковлевна, канд. мед. наук, старш. науч. сотр. лаб. комбинированных повреждений и шока ФГБУ НИИОПП РАМН

Мацневский Дмитрий Дмитриевич, канд. тех. наук, зав. биоинженерной лаб. ФГБУ НИИОПП РАМН

Решетняк Виталий Кузьмич, чл.-корр. РАМН, д-р мед. наук, проф., зав. отд. ФГБУ НИИОПП РАМН

Г.В. Порядин<sup>1</sup>, О.А. Богинская<sup>2</sup>, С.А. Обрубов<sup>1</sup>, М.И. Пыков<sup>3</sup>, Е.С. Колбатова<sup>4</sup>, Л.Г. Дубовик<sup>4</sup>

## **Особенности состояния вегетативной нервной системы у детей с близорукостью, ассоциированной с недифференцированной дисплазией соединительной ткани**

<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> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии

и иммунологии им. Д. Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117513, Москва, ул. Саморы Машелы, 1

<sup>3</sup> Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования

«Российская медицинская академия последипломого образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

123836, Москва, ул. Баррикадная, 2/1

<sup>4</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российская детская клиническая больница»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117513, Москва, Ленинский пр-т, 117

*Цель исследования — оценка состояния вегетативной нервной системы (ВНС) у детей на фоне недифференцированной дисплазии соединительной ткани (НДСТ). Обследовано 50 детей, находившихся на диспансерном учете у офтальмолога, с диагнозом близорукость приобретенная, прогрессирующая на фоне недифференцированной дисплазии соединительной ткани. Проводили оценку состояния ВНС на программно-аппаратном комплексе «Валента», с регистрацией ЭКГ. Выявлено, что преобладающей тенденцией в изменении состояния ВНС у детей с близорукостью на фоне НДСТ являются неудовлетворительные адаптационные возможности организма на фоне вагосимпатического дисбаланса с относительным или абсолютным преобладанием симпатических или парасимпатических влияний и неспособность ВНС быстро адаптироваться к возрастающей нагрузке. Аккомодационные нарушения при близорукости у детей могут быть проявлением дисрегуляторных нарушений в работе ресничной мышцы вследствие изменений вегетативного обеспечения деятельности.*

**Ключевые слова:** вегетативная нервная система, дисплазия соединительной ткани, близорукость, аккомодационные нарушения

G.V. Poryadin<sup>1</sup>, O.A. Boginskaya<sup>2</sup>, S.A. Obrubov<sup>1</sup>, M.I. Pykov<sup>3</sup>, E.S. Kolbatova<sup>4</sup>, L.G. Dubovik<sup>4</sup>

## **Characteristics of the autonomic nervous system state in children with myopia associated with undifferentiated connective tissue dysplasia**

<sup>1</sup> Russian National Research Medical University, 1, Ostrovitana str., 117997 Moscow, Russia

<sup>2</sup> Russian Federal Research Center of Pediatric Oncology, Haematology and Immunology, 1, Samory Mashela str., 117997 Moscow, Russia

<sup>3</sup> Russian Medical Academy of Postgraduate Education, 2/1Barrikadnaya str., 123995, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Russian Federal Pediatric Hospital, 117 Leninsky pr., 117997, Moscow, Russia

*Autonomic nervous system disorders occur in 100% cases in patients with connective tissue dysplasia. Biomechanism of accommodation and autonomic innervation of ciliary body was not investigated clearly and presented as area of further research. The goal of the study was to evaluate features of autonomic nervous system in patients with myopia associated with connective tissue dysplasia. 50 children with myopia associated with connective tissue dysplasia went through ophthalmological examination. To evaluate function of autonomic nervous system all patients were observed with the machine «Valenta» which has ECG recording. As a result we found that children with myopia and connective tissue dysplasia have unsatisfactory adaptive reserves with imbalance of sympathetic and parasympathetic input, autonomic nervous system wasn't available to provide homeostasis in demanding level. We hypothesized that autonomic nervous system might be a reason which lead to disorders in process of accommodation during myopia and assist its progressing.*

**Key words:** autonomic nervous system, connective tissue dysplasia, myopia, accommodative dysfunction

Вегетативной нервной системе принадлежит важная роль в жизнедеятельности организма, связанная с поддержанием постоянства внутренней среды организма и обеспечением различных форм психической и физической деятельности. Ведущим звеном, участвующим в надсегментарной вегетативной регуляции, является лимбико-ретикулярный комплекс. Структурные особенности комплекса имеют наследственный характер, что может предопределять аномальный характер нейровегетативных реакций [3]. Так, генетическая неполноценность коллагена при дисплазии соединительной ткани (ДСТ) предполагает вовлеченность в патологический процесс вегетативной нервной системы [5, 6, 13]. По данным литературы, психовегетативные нарушения у пациентов с ДСТ встречаются практически в 100% случаев [14]. Наличие антагонистических влияний вегетативной нервной системы является важным механизмом адаптации с целью поддержания гомеостаза. Так, благодаря двойственной иннервации ресничной мышцы осуществляется аккомодационная функция приспособления глаза к четкой визуализации разноудаленных объектов за счет изменения рефракции [8]. Вопросы вегетативного регулирования и биомеханизма аккомодации представляют несомненный интерес в связи с возможной ролью ВНС в патогенезе прогрессирования близорукости [2, 4, 17].

*Цель исследования* — оценка состояния вегетативной нервной системы у детей с близорукостью, ассоциированной с недифференцированной дисплазией соединительной ткани (НДСТ).

### Методика

В клиническое исследование были включены 50 детей, находившихся на диспансерном учете у офтальмолога, с диагнозом близорукость приобретенная, прогрессирующая на фоне НДСТ. Среди них 24 ребенка с близорукостью слабой степени и 26 с близорукостью средней степени. Наличие системной мезенхимальной дисфункции у детей устанавливалось по внешним и внутренним фенотипическим признакам дисплазии соединительной ткани, выявленным при оценке клинического состояния ребенка и осмотре с помощью комплекса специальных методов исследования. Обследования проводили с использованием современной диагностической аппаратуры с помощью принятых в офтальмологии методик, включающих визометрию, офтальмоскопию, биомикроскопию, авторефрактометрию, эхобиометрию. У всех пациентов оценивали состояние вегетативной нервной системы на программно-аппаратном комплексе «Валента», с регистрацией записи ЭКГ, продолжительностью записи от 5 до 7 мин. Запись осуществляли в условиях относительного покоя в положении «лежа», далее вы-

полнялась активная клиноортостатическая проба (АОП) для оценки способности регуляторных систем адекватно отвечать на воздействие (запись 6 мин). Анализировались параметры, которые рассчитывались в соответствии с кардиоритмологическими стандартами (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology, 1996) [7]. Методом спектрального анализа оценивали показатели: индекс напряжения регуляторных систем (SI), суммарную мощность спектра variability сердечного ритма (TP), показатели мощности в высокочастотном диапазоне 0,4—0,15 Гц (HF и HF в %), в низкочастотном диапазоне 0,15—0,04 Гц (LF и LF в %), в сверхнизкочастотном диапазоне 0,04—0,015 Гц (VLF и VLF в %), рассчитывали также индекс отношения средних мощностей (LF/HF) и индекс вагосимпатического равновесия [1]. При анализе результатов, полученных после проведения АОП прирост величины вышеуказанных показателей (в %) рассчитывался по отношению к исходным данным в состоянии покоя. Статистический анализ variability сердечного ритма (BCP) включал изучение гистограмм по следующим показателям: d (или SDNN) — стандартное отклонение RR и вариационный размах (MxDMn), определяющих активность парасимпатического отдела; Mo — мода, величина RR наиболее часто встречающаяся и характеризующая активность гуморального звена регуляции; AMo (%) — амплитуда моды (процент наиболее частых RR (Mo)), отражающая активность симпатического отдела вегетативной нервной системы; ИН — индекс напряжения (ИН, усл.ед. = AMo/2Mo MxDMn) характеризует степень централизации управления ритмом и является интегральным показателем напряженности адаптационно-компенсаторных механизмов [1]; ЧСС средняя — интегральный показатель; ИВР — индекс вегетативного равновесия; ИФС — индекс функционального состояния. На основании анализа временных и спектральных характеристик составлялось заключение о текущем функциональном состоянии вагосимпатического баланса, реактивности отделов ВНС, возможностях адаптации и вегетативного обеспечения деятельности. Степень достоверности различий изучаемых показателей определялась по критерию t-Стьюдента, уровень значимости считался значимым при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

При оценке текущего функционального состояния ВНС у детей с близорукостью выявлено, что удовлетворительные показатели и снижение последних встречались с одинаковой частотой в 48% случаев. У 4% детей отмечено повышение показателей, харак-

теризующих общее функциональное состояние организма, что соответствует мобилизационной фазе эрготропной деятельности и отражает отклонение от нормы в покое (рис. 1) [11].

Оценка вагосимпатического баланса у детей с близорукостью на фоне НДСТ показала, что преобладающими оставались нарушения вегетативного баланса в виде преобладания симпатических влияний в 46% наблюдений и парасимпатических влияний — 32% случаев. Кардиоритмограмма, отражающая нормотонию, отмечена лишь в 22% случаев (рис. 2).

При анализе показателей реактивности организма особое значение имеет сила реакции (размах колебаний показателей вегетативного баланса) и ее длительность (возврат показателей к исходному уровню).

У детей с близорукостью на фоне НДСТ при проведении АОП преобладало нарушение парасимпатических влияний (62% случаев) на фоне преимущественно симпатических влияний в покое. Реактивность с нарушением симпатических влияний встречалась лишь в 10% случаев. Реактивность, характеризующаяся нормальным уровнем показателей, выявлена в 28% случаев (рис. 3).

В результате проведенного исследования в 24% случаев установлены удовлетворительные показатели адаптационных возможностей организма, т.е. определялось напряжение центральных симпатических механизмов регуляции при исходно низком их уровне их влияния на сердечный ритм [16]. У 72% детей с близорукостью на фоне НДСТ выявлена недостаточность адаптационных реакций, что проявляется снижением активности центральных механизмов и усилением парасимпатических влияний на сердце на фоне высокого напряжения центральных симпатических механизмов в состоянии покоя [16]. Напряжение механизмов адаптации, т.е. повышение активности центрального контура при исходно высоком его уровне адаптации, отмечалось в 4% случаев (рис. 4). Подобное состояние может приводить к срыву адаптации и истощению функциональных систем организма [16].

Установлено также, что в 90% случаев у детей с близорукостью на фоне НДСТ вегетативное обеспечение деятельности осуществлялось по гуморально-метаболическому пути регуляции сердечного ритма, что указывает на переход регуляции сердечного ритма с рефлекторного вегетативного уровня на более низкий гуморально-метаболический, который не способен быстро обеспечивать гомеостаз [12]. И лишь в 10% случаев вегетативное обеспечение деятельности осуществлялось за счет симпатико-адреналовых влияний, что соответствует физиологичной реакции организма на возрастающую нагрузку (рис. 5) [12].

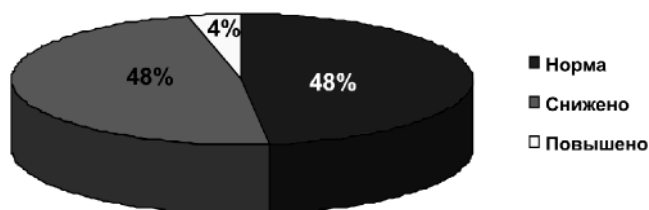


Рис. 1. Функциональное состояние вегетативной нервной системы у детей с близорукостью, ассоциированной с дисплазией соединительной ткани

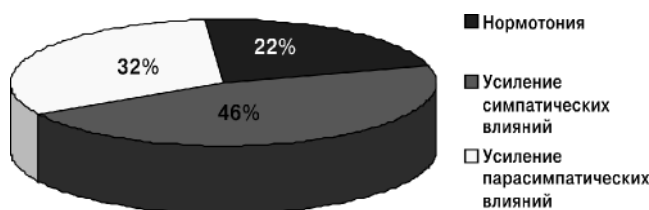


Рис. 2. Вагосимпатический баланс у детей с близорукостью, ассоциированной с дисплазией соединительной ткани

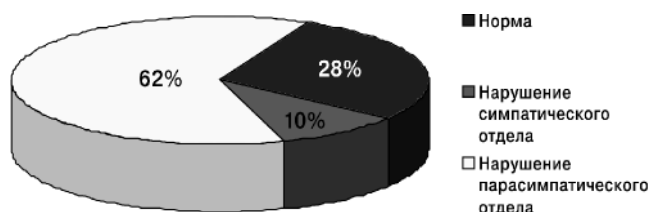


Рис. 3. Реактивность вегетативной нервной системы у детей с близорукостью, ассоциированной с дисплазией соединительной ткани

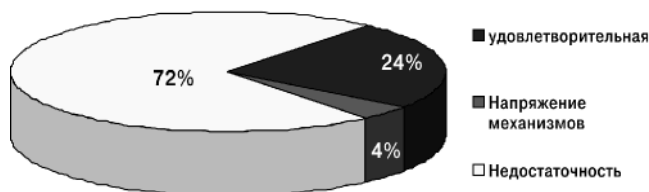


Рис. 4. Адаптационные реакции у детей с близорукостью, ассоциированной с дисплазией соединительной ткани

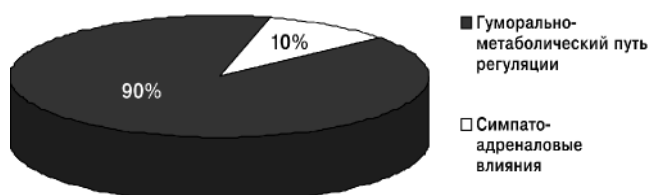


Рис. 5. Вегетативное обеспечение деятельности у детей с близорукостью, ассоциированной с дисплазией соединительной ткани

Таким образом, при оценке состояния вегетативной нервной системы у детей с близорукостью на фоне НДСТ выявлены разнообразные нарушения в системе вегетативной регуляции физиологических функций. Преобладающей тенденцией является неудовлетворительные адаптационные возможности организма на фоне вагосимпатического дисбаланса с относительным или абсолютным преобладанием симпатических или парасимпатических влияний и неспособность ВНС быстро обеспечивать гомеостаз при возрастающей нагрузке. Несмотря на то, что при анализе каждого параметра состояния ВНС встречались характеристики, соответствующие физиологической норме, при детальной оценке показателей у каждого ребенка с близорукостью на фоне НДСТ у всех детей были выявлены отклонения того, или иного параметра, характеризующего состояние ВНС.

Согласно современным взглядам, в основе вегетативных дисфункций наряду с конституционально-генетической предрасположенностью лежат фенотипические модификации различных видов регуляции центрального и периферического уровня [9]. Вовлечение в патологическую систему конкретного висцерального органа с изменением его функции является проявлением соответствующего нейровисцерального вегетативного синдрома [10, 18, 19, 20]. Так, аккомодационные нарушения при близорукости у детей могут быть проявлением дисрегуляторных нарушений в работе ресничной мышцы вследствие изменений вегетативного обеспечения деятельности. Данное предположение согласуется с результатами ранее проведенных нами исследований о возможной роли ВНС в осуществлении аккомодационных нарушений при близорукости [15].

Таким образом, для лечения пациентов с близорукостью на фоне НДСТ следует разрабатывать новые методы как локального воздействия на структуры глаза, устраняющие уже существующие изменения, так и системного влияния на организм с целью стабилизации функционального состояния ВНС, запускающей каскад реакций прогрессирования близорукости у детей, что требует вовлечения в процесс лечения близорукости не только офтальмологов, но и врачей других специальностей.

### Список литературы

1. *Баевский Р.М., Иванов Г.Г., Чирейкин Л.В., Гаврилушкин А.П.* и соавт. Анализ variability сердечного ритма при использовании различных электрокардиографических систем // Вестник Аритмологии. — 2011. — №24. — С. 75.
2. *Ватченко А.А.* Предспазмы аккомодации в патогенезе приобретённой миопии и формы её профилактики и лечения: Автореф. дисс. на соискание учёной степени д.м.н. — Днепропетровск, 1979. — С. 5.
3. *Вейн А.М.* Вегетативные расстройства: клиника, диагностика, лечение. — М.: ООО «МИА», 2003. — С. 752.
4. *Виденина И.В.* Роль вегетативной нервной системы в развитии отдельных форм миопии у детей дошкольного и школьного возрастов // Офтальмологический журнал. — 1992. — №5-6. — С. 262-264.
5. *Гордон И.Б.* Церебральные и периферические вегетативные расстройства в клинической кардиологии. — М.: Медицина, 1994. — С. 160.
6. *Кадурина Т.И.* Наследственные коллагенопатии: клиника, диагностика, лечение, диспансеризация. — СПб.: Невский диалект, 2000. — С. 270.
7. *Калиниченко И.А.* Variability сердечного ритма у школьников разных соматотипов // Тезисы докладов IV Российского симпозиума с международным участием. Ижевск, 19-21 ноября 2008 г. — С. 124.
8. *Катаргина Л.А.* Аккомодация: Руководство для врачей. — М.: Апрель, 2012. — С. 7.
9. *Комаров В.Р., Кучма Л.А., Носкин Г.Д.* Полисистемный саногенетический мониторинг. — М.: МИПКРО, 2001. — С. 344.
10. *Крыжановский Г.Н.* Дизрегуляторная патология // Патол. физиология и эксперим. терапия. — 2002. — №3. — С. 2-19.
11. *Машиш В.А.* Трёхфакторная модель variability сердечного ритма. Часть 2: Исследование состояний при моделировании операторской деятельности. Труды психологической службы в атомной энергетике и промышленности. Т. 3. — Обнинск, 2007. — С. 190-198.
12. *Михайлов В.М.* Variability сердечного ритма. Опыт практического применения. — Иваново, 2000. — С. 80.
13. *Нечаева Г.И.* Кардиогемодинамические синдромы при дисплазии соединительной ткани (клиника, диагностика, прогноз): Автореф. дисс. на соискание учёной степени д.м.н. — Томск, 1994. — С. 37.
14. *Нечаева Г.И., Викторова И.А.* Дисплазия соединительной ткани: терминология, диагностика, тактика ведения пациентов: Монография. — Омск: БЛАНКОМ, 2007. — С. 186.
15. *Обрубов С.А., Богинская О.А., Румянцев С.А., Юрова М.Ю., Иванова А.О., Потапова Л.С.* Исследование аккомодации при близорукости на фоне недифференцированной дисплазии соединительной ткани // Вестник офтальмологии. — 2012. — №5. — С. 22-25.
16. *Попова Т.В., Кокорева Е.Г., Коурова О.Г.* Возрастные особенности центральных механизмов регуляции сердечного ритма при сенсорных нарушениях у детей. Variability сердечного ритма: теоретические аспекты и практическое применение // Тезисы докладов IV Российского симпозиума с международным участием. Ижевск, 19-21 ноября 2008 г. — С. 253.
17. *Чудонал Е.А.* Комплексная оценка функционального состояния зрительного анализатора при близорукости с учетом нейрофизиологических механизмов его центрального отдела: Автореф. дисс. на соискание учёной степени к.м.н. — Ростов-на-Дону, 2004. — С. 16.
18. *Яковлев В.М., Нечаева Г.И.* Кардиореспираторные синдромы при дисплазии соединительной ткани. — Омск: ОГМА, 1994. — С. 20.
19. *Lakhan K., Leonard A., Seifalian A.M., Hardiman P.* Microvascular dysfunction in women with polycystic ovary syndrome // Hum. Reprod. — 2005. — Vol. 20, №11. — P. 3219-3224.
20. *Shigeki T.* Epidemiological studies on obesity in a Japanese rural district the metabolic aspects of adult obesity comparing with child obesity // Bull. Osaka Med. School. — 1983. — Vol. 29. — No1. — P. 43-53.

Поступила 30.04.13

**Сведения об авторах:**

*Геннадий Васильевич Порядин*, д-р мед. наук, проф., чл.-корр. РАМН, зав. каф. патологической физиологии ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России

*Обрубов Сергей Анатольевич*, д-р мед. наук, проф. каф. офтальмологии педиатрического факультета ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России

*Пыков Михаил Иванович*, д-р мед. наук, проф., зав. каф. лучевой диагностики детского возраста ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России

*Колбатова Елена Сергеевна*, врач функциональной диагностики ФГБУ РДКБ Минздрава России

*Дубовик Лариса Григорьевна*, врач ФГБУ РДКБ Минздрава России

С.И. Игонькина, Л.А. Ветрилэ, М.Л. Кукушкин

## **Роль антител к нейромедиаторам антиноцицептивной системы в механизмах невропатической боли**

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

*Цель исследования — изучение роли антител к нейромедиаторам антиноцицептивной системы в патогенезе невропатической боли. Показано, что развитие экспериментального невропатического болевого синдрома сопровождается продукцией аутоантител к нейромедиаторам антиноцицептивной системы — ГАМК, серотонину, норадреналину и дофамину. Установлено, что антитела к нейромедиаторам антиноцицептивной системы оказывают проноцицептивное действие.*

**Ключевые слова:** невропатическая боль, антиноцицептивная система, нейромедиаторы, антитела к ГАМК, серотонину, норадреналину, дофамину

S.I. Igonkina, L.A. Vetrile, M.L. Kukushkin

## **The role of antibodies to neurotransmitters of antinociceptive system in mechanisms of neuropathic pain**

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

*The present investigation was undertaken in order to study the role of the antibodies to neurotransmitters of antinociceptive system in pathogenesis of neuropathic pain on models of neuropathic pain. It was shown that the development of experimental neuropathic pain syndrome is accompanied with induction of autoantibodies to GABA, serotonin, noradrenalin and dopamine. It was established that the antibodies to neurotransmitters of antinociceptive system have a pronociceptive effect.*

**Key words:** neuropathic pain, antinociceptive system, neurotransmitters, antibodies to GABA to GABA, serotonin, noradrenalin, dopamine

В последние десятилетия накапливается фактический материал, который свидетельствует о роли иммунологических механизмов в развитии неврологических заболеваний. Показано, что антитела, направленные против нейромедиаторов и их рецепторов, участвуют в патогенезе многих неврологических заболеваний. Так, антитела к нейромедиаторам и их рецепторам обнаруживаются при эпилепсии, синдроме Гийена—Барре, рассеянном склерозе, энцефалите, мультифокальной моторной невропатии, у пациентов с геморрагическим и ишемическим инсультами [1, 8, 10, 14, 16, 19]. Однако вопрос о роли антител к нейромедиаторам антиноцицептивной системы в патогенезе невропатической боли остается открытым.

Антиноцицептивная система осуществляет контроль активности ноцицептивных нейронов и ее деятельность влияет на болевую чувствительность и анальгезию [6, 7, 18]. Нарушение антиноцицептивной регуляции на раз-

ных уровнях ЦНС способствует формированию базисных нейрональных механизмов невропатической боли [4, 5, 12, 13]. Особую роль в антиноцицептивной модуляции невропатической боли играют нейромедиаторы ГАМК, серотонин, норадреналин и дофамин. Дефицит ГАМКергического и моноаминергического торможения в антиноцицептивной системе приводит к развитию характерных признаков невропатической боли [4, 6, 7]. Напротив, использование агонистов ГАМК<sub>A</sub>- и ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов у пациентов с невропатическими болевыми синдромами демонстрирует их высокую терапевтическую эффективность, а блокаторы обратного захвата нейромедиаторов норадреналина и серотонина оказывают обезболивающее действие при невропатической боли, резистентной к традиционным анальгетикам [7, 11, 12, 15, 17, 18].

*Цель исследования — изучение роли антител к нейромедиаторам антиноцицептивной системы — ГАМК, серотонину, норадреналину и дофамину в развитии невропатической боли. В задачи исследования входило выяснение возможности образования аутоантител к ГАМК, серотонину, норадреналину и*

**Для корреспонденции:** Игонькина Светлана Ивановна, д-р биол. наук, главн. науч. сотр. лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБУ «НИИ ОПП» РАМН, 125315, Москва, Балтийская ул., д. 8. E-mail: labpain@rambler.ru



дофамину у животных с невропатической болью и установление особенностей протекания невропатического болевого синдрома у животных, иммунизированных соответствующим конъюгированным антигеном нейромедиатор-белок.

### Методика

Работа выполнена на крысах-самцах Wistar массой 220—250 г в соответствии с этическими требованиями, предусмотренными Международной и Российской ассоциациями по изучению боли при проведении поведенческих и нейрофизиологических исследований на животных.

#### *Моделирование невропатической боли*

В работе использованы две экспериментальные модели невропатической боли: модель периферической невропатической боли и модель центрального болевого синдрома.

Модель периферической невропатической боли создавали повреждением седалищного нерва. Для этого у животных в условиях гексеналового наркоза обнажали нерв, и после наложения лигатуры нерв перерезали дистальнее места перевязки. О возникновении у животных невропатического болевого синдрома свидетельствовала реакция аутономии, т.е. реакция самоповреждения пальцев ипсилатеральной задней конечности. Для оценки выраженности невропатической боли использовали общепринятую 11-балльную шкалу степени аутономий, учитывающую повреждение когтей, фаланг и стоп оперированной лапы [9]. Динамику процесса учитывали ежедневно на протяжении 63 дней после операции.

Для моделирования невропатического центрального болевого синдрома использовали метод агаровой пластинки [4]. Агаровую пластинку, содержащую в исходном растворе антагонист ГАМК<sub>A</sub> рецепторов — пенициллин или антитела к ГАМК апплицировали животным под эфирным наркозом после ламинэктомии на дорсальную поверхность люмбального отдела спинного мозга (L4—L6). Для количественной оценки спонтанных приступов и механической аллодинии, возникающих у животных с моделью центральной невропатической боли, использовали аккумулятивный показатель аллодинии (АПА) и аккумулятивный показатель спонтанных приступов боли (АПБ) [3]. Показатель АПА учитывал выраженность аллодинии в баллах изону ее распространения, определенную по количеству точек, тактильное раздражение которых вызывало болевую реакцию. Показатель АПБ учитывали интенсивность болевых приступов в баллах и их общую длительность в фиксированном (1 мин) интервале времени.

#### *Иммунологические методы*

Наличие аутоантител к нейромедиаторам определяли в сыворотке крови животных с помощью метода твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), проводимого на полистироловых планшетах, сенсбилизированных соответствующими тест-антигенами. Содержание антител оценивали по оптической плотности сыворотки крови при длине волны 495 нм с использованием считывающего устройства «MINI-READER» фирмы «DYNATECK» (Швейцария) и выражали в условных единицах активности (усл.ед.) показателем К, представляющим собой отношение оптической плотности сыворотки крови каждого подопытного животного к среднему значению оптической плотности сыворотки интактных крыс. Специфичность антител определяли в реакции конкурентного торможения нейромедиатором. Аутоантитела к нейромедиаторам в сыворотке крови животных с невропатическим болевым синдромом определяли на 14-е и 28-е сут. после операции.

Антитела к ГАМК в виде гамма-глобулиновых фракций выделяли из сыворотки крови кроликов, гипериммунизированных конъюгированным антигеном ГАМК-бычий сывороточный альбумин (БСА), методом переосаждения сульфатом аммония, очищения диализом и лиофилирования. Аналогичным образом выделяли гамма-глобулиновую фракцию у интактных неиммунизированных кроликов, которую использовали для введения животным контрольной группы.

Для иммунизации животных использовали конъюгированные антигены ГАМК-БСА, серотонин-БСА, норадреналин-БСА и дофамин-БСА, которые вводили по следующей схеме:

1-я инъекция — введение конъюгированного антигена (2 мг на кг массы, 0,5 мл) с полным адьювантом Фрейнда подкожно в 6 точек поясничной области спины за 2 нед. до операции на нерве;

2-я — внутрибрюшинная, через 2 нед. после первой иммунизации в дозе 5 мг на кг массы без адьюванта;

3-я — внутрибрюшинная, через 4 нед. после первой иммунизации в дозе 10 мг на кг массы без адьюванта;

4-я — реиммунизация через 1 мес. после 3-й инъекции конъюгатом в дозе 15 мг на 1 кг массы без адьюванта.

Животным контрольных групп вводили 0,9% NaCl или БСА.

Статистическую и математическую обработку данных проводили с помощью программ Microsoft Excell и Statistica 6.0, использовали метод Фишера, t-критерий Стьюдента, критерий Манна—Уитни. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

**Индукция аутоантител к нейромедиаторам  
у крыс с невропатическим болевым синдромом, вызванным повреждением седалищного нерва**

Аутоантитела к нейромедиаторам	Показатели			
	Показатель К (усл. ед.), показывающий наличие аутоантител к нейромедиатору		Частота выявления аутоантител к нейромедиатору	
	14 сут.	28 сут.	14 сут.	28 сут.
Аутоантитела к ГАМК (n=10)	1,45±0,06 *	1,55±0,02 *	67% *	17%
Аутоантитела к серотонину (n=10)	1,87±0,18*	1,72±0,11*	77% *	74% *
Аутоантитела к дофамину (n=10)	2,5±0,17	1,85±0,11*	88% *	90% *
Аутоантитела к норадреналину (n=10)	1,56±0,09*	1,57±0,1*	73% *	60% *

Примечание. \* — статистически значимые ( $p < 0,05$ ) различия по сравнению с интактными крысами

### Результаты и обсуждение

В 1-й серии экспериментов исследовали сыворотку крови животных с невропатическим болевым синдромом, вызванным повреждением седалищного нерва, на наличие аутоантител к нейромедиаторам в динамике на 14-е и 28-е сут. после операции. В эти сроки у животных невропатический болевой синдром достигал максимального развития. Данные об уровне антителообразования к нейромедиаторам при развитии невропатической боли у подопытных животных представлены в таблице. Как видно из таблицы, аутоантитела ко всем исследуемым нейромедиаторам выявлены в большом проценте случаев. У интактных крыс антитела к исследуемым нейромедиаторам не были выявлены.

Во 2-й серии экспериментов изучали особенности протекания невропатического болевого синдрома у животных при их иммунизации соответствующим конъюгированным антигеном нейромедиатор-белок в динамике в течение 63 сут.

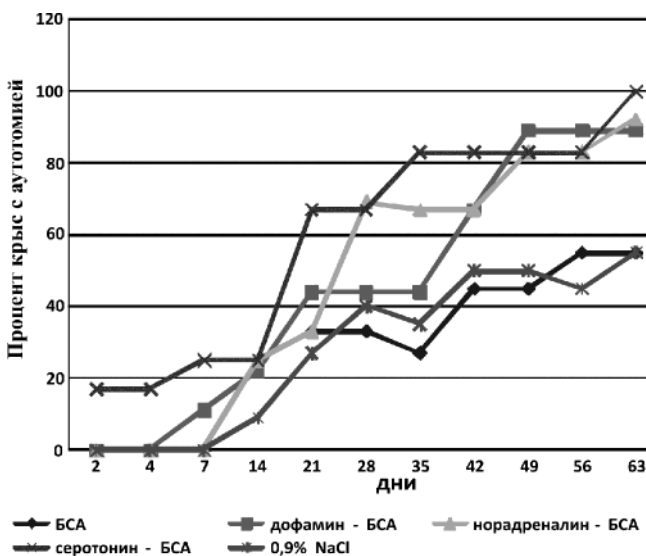


Рис. 1. Развитие невропатического болевого синдрома у крыс на фоне иммунизации конъюгированным антигеном нейромедиатор-белок. По оси ординат — процент животных с аутоиммунитетом, по оси абсцисс — дни тестирования после перерезки нерва

Как показали эксперименты, иммунизация животных антигеном серотонин-БСА (n=10), норадреналин-БСА (n=10) или дофамин-БСА (n=10) изменяла течение болевого синдрома, у подопытных животных болевой синдром протекал тяжелее. На фоне иммунизации существенно возрастал процент животных с аутоиммунитетом (рис. 1). При этом, если в контрольных группах после перерезки нерва процент животных с аутоиммунитетом равнялся 45—55%, то в опытных группах у животных, иммунизированных конъюгатом норадреналин-БСА и дофамин-БСА, достигал 90%, а иммунизированных конъюгированным антигеном серотонин-БСА-100%.

На рис. 1 и 2 в легенде обозначены группы животных: 0,9% NaCl — контрольная группа животных, БСА — группа животных, иммунизированных бычьим сывороточным альбумином (БСА), серотонин-БСА — группа животных, иммунизированных конъюгатом серотонин-БСА, норадреналин-БСА — группа животных, иммунизированных конъюгатом норадреналин-БСА, дофамин-БСА — группа животных, иммунизированных конъюгатом дофамин-БСА.

Интенсивность аутоиммунитета у иммунизированных крыс превышала интенсивность аутоиммунитета у неиммунизированных животных. В опытных группах процент животных со среднеинтенсивными и высокоинтенсивными аутоиммунитетами был больше, чем процент таких животных в контрольной группе ( $p < 0,05$ ). Среди животных, иммунизированных конъюгатом серотонин-БСА, преобладали (75%) животные со среднеинтенсивной в 3—6 баллов и высокоинтенсивной в 7—11 баллов аутоиммунитетом, среди иммунизированных конъюгатом дофамин-белок, преобладали крысы со средней выраженностью аутоиммунитета в 3—6 баллов, а в группе животных, иммунизированных конъюгатом норадреналин-БСА, высокоинтенсивные аутоиммунитеты были более чем у половины животных (рис.2А). В контрольной группе у большинства животных выраженность болевого синдрома составила 1—2 балла (рис. 2А).

Существенным образом иммунизация влияла на поздние сроки развития болевого синдрома (рис. 2Б). Начиная с 7-й нед., отмечалось разнонаправленное течение процесса у контрольных и подопытных крыс. В контрольной группе болевой синдром уменьшался, число животных с аутономией снижалось с 70% до 55%, наступала фаза восстановления (рис. 1Б), а в опытных группах фаза восстановления отсутствовала, частота аутономий в группе возрастала до 100%, у животных наблюдали поздние аутономии. Таким образом, у неиммунизированных животных происходило выздоровление, а у иммунизированных возникало обострение процесса.

Уровень аутоантител к нейромедиаторам у иммунизированных животных был значительно выше, чем у животных контрольной группы ( $p < 0,05$ ). Через 9 недель у неиммунизированных крыс аутоантитела к нейромедиаторам уже не обнаруживались ( $K=0,820,16$  усл. ед.), а у иммунизированных конъюгатами серотонин-БСА, норадреналин-БСА и дофамин-БСА крыс показатели уровня аутоантител соответственно равнялись  $K=3,160,71$  усл. ед.,  $K=4,050,5$  усл. ед. и  $K=3,550,71$  усл. ед.

Таким образом, данные исследования свидетельствуют, что развитие невропатического болевого синдрома, сопровождается образованием аутоантител к нейромедиаторам антиноцицептивной системы и что на фоне повышенной индукции аутоантител к этим нейромедиаторам, вызванной иммунизацией животных конъюгированным антигеном нейромедиатор-белок, происходит усиление невропатического болевого синдрома.

В 3-й серии экспериментов изучали эффекты антител к нейромедиатору ГАМК на болевую чувствительность при непосредственном введении антител в ключевую структуру ноцицептивной системы — в дорсальные рога люмбального отдела (L4-L6) спинного мозга. Эффекты антител к ГАМК сравнивали с эффектами блокатора ГАМК<sub>A</sub> рецепторов. Интратекальное (L4-L6) введение антагониста ГАМК<sub>A</sub> рецепторов — пенициллина вызывало у животных ( $n=6$ ) развитие невропатической боли — центрального болевого синдрома. Начальные проявления центрального болевого синдрома в виде аллодинии и спонтанных приступов боли возникали через 5—10 мин после аппликации пенициллина и достигали максимальных величин через 30 мин, при этом показатели центрального болевого синдрома равнялись АПА =  $61,5 \pm 4,5$  и АПБ =  $121 \pm 20,5$ .

Интратекальное введение животным ( $n=6$ ) 300 мкг антител к ГАМК приводило к появлению у подопытных животных механической аллодинии (рис. 3). Легкое тактильное воздействие кисточкой на дерматомы, подвергшиеся воздействию антител к ГАМК, вызывало у всех животных болевую реакцию. Начальные проявления аллодинии так же, как и при введении пенициллина, возникали через 10—15 мин ( $АПА = 21,1 \pm 4,3$ ). К 30-й минуте после аппликации антител к ГАМК интенсивность и площадь аллодинии достигала максимальных значений ( $АПА =$

$34,6 \pm 17,08$ ), через 60 мин регистрировали ее минимальные значения ( $АПА = 9,2 \pm 1,6$ ). Спонтанные приступы при введении 300 мкг антител к ГАМК не возникали. Механическая аллодиния, вызванная антителами к ГАМК была менее выражена, чем аллодиния, вызванная антагонистом ГАМК<sub>A</sub> рецепторов. У контрольных животных ( $n=6$ ), которым интратекально вводили  $\gamma$ -глобулин, ни аллодинии, ни спонтанных приступов не наблюдали.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что развитие невропатического болевого синдрома сопровождается продукцией аутоантител к нейромедиаторам антиноцицептивной системы — ГАМК, серотонину, норадреналину и дофамину, и что на фоне повышенной продукции антител к нейромедиаторам антиноцицептивной системы у животных происходит усиление невропатической боли, провоцируется аллодиния, не наступает фаза выздоровления. Анализ влияния антител к ГАМК, серотонину, норадреналину и дофамину на развитие невропатической боли позволяет сделать следующее заключение о роли антител к

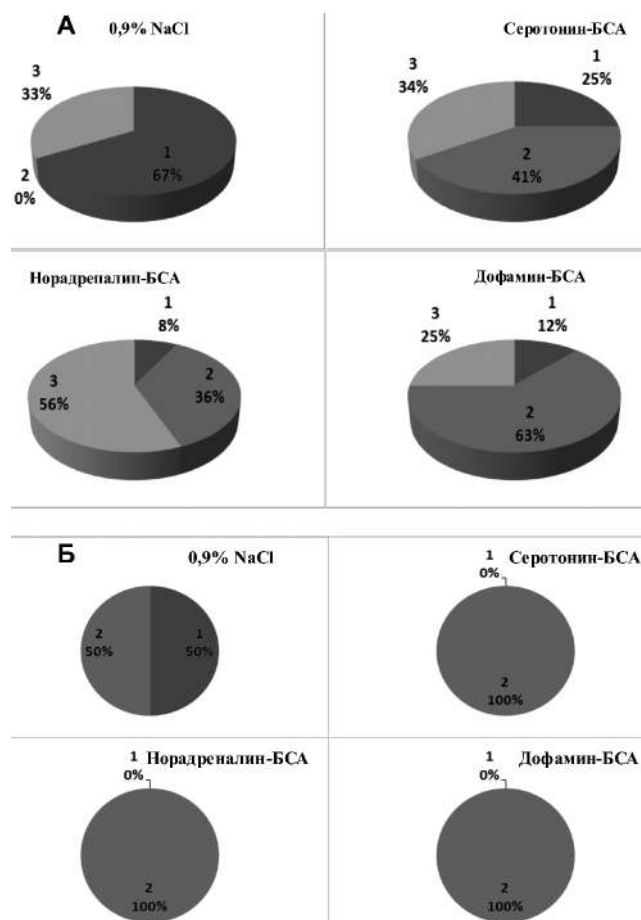


Рис. 2. Влияние иммунизации конъюгатом нейромедиатор-белок на выраженность невропатического болевого синдрома у крыс: А — процентное соотношение крыс с низко- (1), средне- (2) и высокоинтенсивной (3) аутономией; Б — процентное соотношение крыс с наличием фазы выздоровления (1) и наличием поздних аутономий (2)

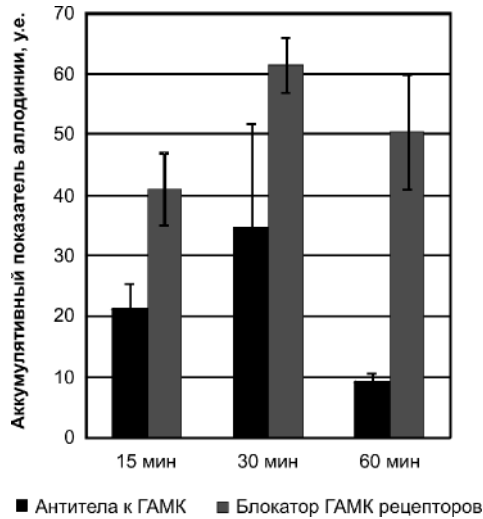


Рис. 3. Аллодиния, вызванная интратекальным введением крысам антител к ГАМК и блокатора ГАМК<sub>A</sub> рецепторов в дорсальные рога люмбального отдела спинного мозга. По оси ординат: аккумулятивный показатель аллодинии (АПА), выраженный в условных единицах. По оси абсцисс: время после интратекального введения веществ

нейромедиаторам ангиоцицептивной системы в развитии невропатической боли: антитела к ГАМК, серотонину, норадреналину и дофамину обладают проноцицептивным действием. Этот эффект может быть обусловлен изменением синаптической нейромедиации. В литературе имеются сообщения, что нейромодулирующие влияния антител могут опосредоваться как за счет изменения уровня нейромедиаторов, так и за счет изменения лигандсвязывающей активности соответствующих рецепторов [2].

### Список литературы

1. Давыдова Т.В., Колобов В.В., Горбатов В.Ю., Захарова И.А., Ветрилэ Л.А., Фомина В.Г., Феденко А.М. Антитела к глутамату, нейродегенеративные повреждения головного мозга. Перспективы иммунотерапии // Патогенез. — 2012. — Т. 10, №3. — С. 26-29
2. Евсеев В.А., Трекова Н.А., Ветрилэ Л.А., Миковская О.И., Башарова Л.А., Грудень, М.А., Хлопушина Т.Г. Нейромодулирующее влияние антител к серотонину на поведенческие реакции, уровень нейромедиаторов в ЦНС и лигандсвязывающую активность рецепторов у мышей линии C57Bl/6 и BALB/c // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 2001. — Т. 132, №7. — С. 26-29.
3. Игонькина С.И., Кукушкин М.Л., Чурюканов М.В., Чурюканов В.В., Бобров М.Ю., Безуглов В.В., Грецкая Н.М. Анальгетическое влияние агонистов каннабиноидных рецепторов на неврогенную боль центрального происхождения // Патогенез. — 2005. — Т. 3, №3. — С. 71-75.
4. Крыжановский Г.Н., Решетняк В.К., Кукушкин М.Л., Игонькина С.И., Графова В.Н., Смирнова В.С.

Патологические интеграции в системе болевой чувствительности при центральном болевом синдроме // Боль. — 2004. — №4 (5). — С. 10-15.

5. Кукушкин М.Л. Невропатическая боль у пациентов с хроническими болями в спине // Боль. — 2008. — №3 (20). — С. 41-46.

6. Кукушкин М.Л., Решетняк В.К. Хронический болевой синдром или боль как самостоятельная форма болезни // Патогенез. — 2003. — №1. — С. 34-42.

7. Кукушкин М.Л., Хитров Н.К. Общая патология боли. — М.: Медицина, 2004. — 144 с.

8. Магаева С.В., Морозов С.Г. Нейроиммунофизиология. — М., 2005. — 158 с.

9. Пшеничкова М.Г., Попкова Е.В., Смирнова В.С., Шимкович М.В., Мальшиев И.Ю., Кукушкин М.Л. Роль катехоламинов в изменении устойчивости к развитию невропатического болевого синдрома при стрессорном воздействии у крыс линии Август и популяции Вистар // Российский журнал боли. — 2011. — 1. — С. 12-16.

10. Скоромец А.А., Дамбинова С.А., Илюхина А.Ю., Сорокоумов В.А. Аутоантитела к глутаматным рецепторам NMDA-типа в крови пациентов с острым ишемическим и геморрагическим инсультом // Журнал неврологии и психиатрии. — 1997. — №6. — С. 53-58.

11. Яхно Н.Н., Кукушкин М.Л., Давыдов О.С., Данилов А.Б., Амелин А.В., Куликов С.М. Результаты Российского эпидемиологического исследования распространенности невропатической боли, ее причин и характеристик в популяции амбулаторных больных, обратившихся к врачу-неврологу // Боль. — 2008. — №3 (20). — С. 24-32.

12. Яхно Н.Н. Методические рекомендации по диагностике и лечению невропатической боли. — М.: Изд-во РАМН, 2008.

13. Basbaum A., Bushnell M.C. Pain: Basic mechanisms // Pain 2002 — An Updated Review: Refresher course Syllabus / Ed. M.A. Giamberardino. — Seattle, IASP Press, 2002. — P. 3-7.

14. Brenner T., Sills G.J., Hart Y., Howell S., Waters P., Brodie M.J., Vincent A., Lang B. Prevalence of neurologic autoantibodies in cohorts of patients with new and established epilepsy // Epilepsia. — 2013. — Vol. 54, №6. — P. 1028-1035.

15. Finnerup N.B., Otto M., McQuay H.J., Jensen T.S., Sindrup S.H. Algorithm for neuropathic pain treatment: An evidence based proposal // Pain. — 2005. — Vol. 118. — P. 289-305.

16. Kuwahara M., Suzuki S., Takada K., Kusunoki S. Antibodies to LM1 and LM1-containing ganglioside complexes in Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy // J. Neuroimmunol. — 2011. — Vol. 239, №1-2. — P. 87-90.

17. Loubser P.G., Akman N.M. Effects of intrathecal baclofen on chronic spinal cord injury pain // Pain Symptomgmt. — 1996. — Vol. 12. — P. 241-247.

18. Rowbotham M.C. Neuropathic pain: from basic science to evidence-based treatment // Pain. — 2002. — An Updated Review: Refresher course Syllabus / Ed. M.A. Giamberardino. — Seattle, IASP Press, 2002. — P. 165-176.

19. Tsutsui K., Kanbayashi T., Tanaka K., Boku S., Ito W., Tokunaga J., Mori A., Hishikawa Y., Shimizu T., Nishino S. Anti-NMDA-receptor antibody detected in encephalitis, schizophrania, and narcolepsy with psychotic features // BMC Psychiatry. — 2012. — 12. — 37.

Поступила 20.05.13

### Сведения об авторах:

Ветрилэ Люция Александровна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. нейроиммунопатологии ФГБУ «НИИ ОПП» РАМН

Кукушкин Михаил Львович, д-р мед. наук, проф., зав. лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБУ «НИИ ОПП» РАМН

Ю.О. Федотова

## Комбинированное введение RJR-2403 с низкой дозой 17 $\beta$ -эстрадиола улучшает пространственное обучение у овариоэктомированных крыс

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, 199034, Санкт-Петербург, ул. Макарова, 6

Цель исследования заключалась в сравнительном анализе эффектов комбинированного введения агониста или антагониста N $\alpha$ 7-холинорецепторов с низкой дозой 17 $\beta$ -эстрадиола на пространственное обучение в водном тесте Морриса и на поведении в тесте «открытое поле» у овариоэктомированных (ОЭ) самок крыс. Агонист N $\alpha$ 7-холинорецепторов — RJR-2403 (1,0 мг/кг, внутривнутрибрюшинно) и антагонист N $\alpha$ 7-холинорецепторов — мекамиламин (1,0 мг/кг, внутривнутрибрюшинно) вводились (14 сут) изолированно или в комбинации с низкой дозой 17 $\beta$ -эстрадиола (0,5 мкг на животное, подкожно) ОЭ самкам. Установлено, что RJR-2403 в комбинации с низкой дозой 17 $\beta$ -эстрадиола полностью восстанавливает воспроизведение динамики пространственного обучения у овариоэктомированных самок. При этом на фоне введения RJR-2403 в сочетании с 17 $\beta$ -эстрадиолом у ОЭ самок наблюдалось возрастание исследовательской активности и выраженности груминга в тесте «открытое поле». Мекамиламин, введенный изолированно или в комбинации с низкой дозой 17 $\beta$ -эстрадиола, существенно не влиял на характер пространственного обучения в тесте Морриса и поведения в тесте «открытое поле». Результаты настоящего исследования свидетельствуют о позитивном эффекте применения агониста N $\alpha$ 7-холинорецепторов в сочетании с низкой дозой 17 $\beta$ -эстрадиола на пространственное обучение у ОЭ самок крыс.

**Ключевые слова:** RJR-2403, мекамиламин, 17 $\beta$ -эстрадиол, пространственное обучение, тест Морриса, овариоэктомия

Yu.O. Fedotova

## Co-administration of RJR-2403 with low dose of 17 $\beta$ -estradiol on spatial learning in ovariectomized rats

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

The aim of this work was to study the influence of stimulation or blockade N $\alpha$ 7-cholinoreceptors on dynamics of spatial learning in water Morris maze and on behavior in the «open field» test in adult ovariectomized (OVX) females given with a low dose of 17 $\beta$ -estradiol. Agonist of N $\alpha$ 7-cholinoreceptors — RJR-2403 (1,0 mg/kg, i.p.) or antagonist of N $\alpha$ 7-cholinoreceptors — mecamylamine (1,0 mg/kg, i.p.) treated chronically (14 days) alone and in a combination with low dose of 17 $\beta$ -estradiol (0,5  $\mu$ /rat, s.c.) to OVX rats. Co-administration of RJR-2403 with low dose of 17 $\beta$ -estradiol completely restored impaired spatial learning in water Morris maze in OVX females. Moreover, OVX rats treated with RJR-2403 and low dose of 17 $\beta$ -estradiol demonstrated increased exploratory and grooming behavior in the «open field» test. Both mecamylamine alone and in combination with low dose of 17 $\beta$ -estradiol failed to influence on spatial learning and failed to modify behavior in the «open field» test in OVX rats. The results of the present study suggest a positive effect of RJR-2403 in combination with low dose of 17 $\beta$ -estradiol on spatial learning at estrogen deficiency.

**Key words:** N $\alpha$ 7-cholinoreceptors, RJR-2403, mecamylamine, 17 $\beta$ -estradiol, passive avoidance performance, ovariectomy

В последние годы была выявлена значительная роль центральных нейрональных N $\alpha$ 7-никотиновых холинорецепторов в модуляции процессов обучения и

памяти, а также нейропротекции [4, 8, 10, 13]. Установлено, что введение никотина или различных агонистов N $\alpha$ 7-холинорецепторов улучшает рабочую память и внимание в различных тестах у ряда лабораторных животных [11, 14, 15].

Клинические и экспериментальные исследования указывают на существование функциональной взаи-

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

мосвязи между холинергической и гипофизарно-оваривальной системами в реализации когнитивных функций мозга [1, 6]. Полагают, что нарушения, происходящие в холинергической системе при недостатке эстрогенов, в первую очередь, обуславливают развитие целого ряда нейродегенеративных и мнестических расстройств [6, 7, 11]. Показано, что у самок крыс количество и плотность нейрональных  $N\alpha 7$ -холинорецепторов в несколько раз выше по сравнению с самцами крыс [8, 9, 10]. Выявлено, что после овариэктомии заметно снижается уровень экспрессии нейрональных  $N\alpha 7$ -холинорецепторов в головном мозге [11, 12, 13]. Введение эстрогенов овариэктомированным (ОЭ) самкам крыс уже в течение первых нескольких дней заметно повышало количество и активность ацетилхолинтрансферазы, а также количество  $N\alpha 7$ -холинорецепторов в гипоталамусе. Параллельно происходила выраженная регенерация холинергических нейронов [9, 10, 13].

В связи с этим, представляет интерес оценка вовлечения  $N\alpha 7$ -холинорецепторов в реализацию процессов обучения и памяти при дисбалансе эстрогенов в организме. Следует отметить, что такие исследования носят единичный характер и весьма неоднозначны вследствие отсутствия детальной оценки действия как агонистов, так и антагонистов разных типов холинорецепторов на поведенческий статус самок с разным уровнем эстрогенов в организме.

*Цель исследования* — сравнительный анализ эффектов хронического введения агониста и антагониста  $N\alpha 7$ -холинорецепторов, введенных изолированно или в комбинации с низкой дозой  $17\beta$ -эстрадиола на процесс пространственного обучения самок крыс при дефиците эстрогенов.

### Методика

Работа выполнена на 140 белых крысах-самках Вистар в возрасте 3—4 мес., массой 200—220 г, полученных из питомника «Рапполово». Животные содержались в виварии при естественном освещении и максимальной стандартизации температурного и пищевого режимов со свободным доступом к еде и воде. Исследования проводились в первой половине дня (9.00 — 12.00).

Для выполнения поведенческих тестов крыс случайным образом разделяли на несколько групп по 10 особей в каждой:

- 1-я группа — контрольные интактные самки, получавшие физиологический раствор (контроль);
- 2-я группа — контрольные ОЭ самки, получавшие физиологический раствор;
- 3-я группа — ОЭ самки, получавшие  $17\beta$ -эстрадиол (0,5 мкг на крысу, подкожно);

- 4-я группа — ОЭ самки, получавшие RJR-2403;

- 5-я группа — ОЭ самки, получавшие мекамиламин;

- 6-я группа — ОЭ самки, получавшие RJR-2403 в комбинации с  $17\beta$ -эстрадиолом;

- 7-я группа — ОЭ самки, получавшие мекамиламин в комбинации с  $17\beta$ -эстрадиолом.

Все фармакологические препараты были получены из компании Сигма (США). Агонист  $N7$ -холинорецепторов — RJR-2403 и антагонист  $N7$ -холинорецепторов — мекамиламин вводили в дозе 1,0 мг/кг, внутривенно,  $17\beta$ -эстрадиол вводился в дозе 0,5 мкг на животное, подкожно. Применяемые вещества растворяли в физиологическом растворе и вводили в объеме 0,1 мл на крысу массой 200 г.  $17\beta$ -Эстрадиол растворяли в стерильном подсолнечном масле и также вводили в объеме 0,1 мл на крысу массой 200 г. Выбор именно такой дозы  $17\beta$ -эстрадиола обусловлен тем, что экспериментальными исследованиями была установлена эффективность данной дозы  $17\beta$ -эстрадиола в мягкой коррекции эмоционального и гормонального статуса ОЭ самок [6]. Контрольным крысам вводили эквивалентное количество растворителя. Введение веществ осуществляли в течение 14 сут. до начала поведенческого теста через 2 нед. после операции.

Удаление яичников проводили согласно общепринятой методике [2]. Эффективность действия экзогенно вводимого эстрадиола у ОЭ самок оценивали по влагалищным мазкам.

Для выявления способности животных к пространственной ориентации использовали водный тест Морриса [5]. В течение 7 сут. животных обучали поиску скрытой платформы. Местоположение платформы на площади бассейна ежедневно меняли. На 8-е сут. платформу помещали в центр бассейна. В день эксперимента животному предоставлялись две попытки — тренировочная и экспериментальная, интервал между которыми составлял 60 с. Положение платформы для обеих попыток было одинаковым. Контрольное время нахождения животного в бассейне — 3 мин для каждой попытки. Если животное не находило платформу за отведенный отрезок времени, оно помещалось на платформу экспериментатором, а величину латентного периода считали равной 180 с. В течение 3 мин регистрировали время обнаружения платформы в течение тренировочной и экспериментальной попыток.

Поведение животных оценивали в тесте «открытое поле» [4]. Регистрировали следующие параметры: двигательную горизонтальную активность («перемещение») и двигательную вертикальную активность («вставание»); исследовательскую активность

(исследование крысой круглых сквозных отверстий, расположенных на полу); груминговые реакции (вычесывание, вылизывание, умывание и др.); эмоциональные реакции (дефекация и уринация).

Все исследования проводили согласно этическим принципам, изложенным в Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием дисперсионного анализа one-way ANOVA test с последующим Newman—Keuls post-hoc тестом с помощью пакета программ Statistica for Windows 6.0. Различия между значениями при  $p < 0,05$  считали статистически значимыми.

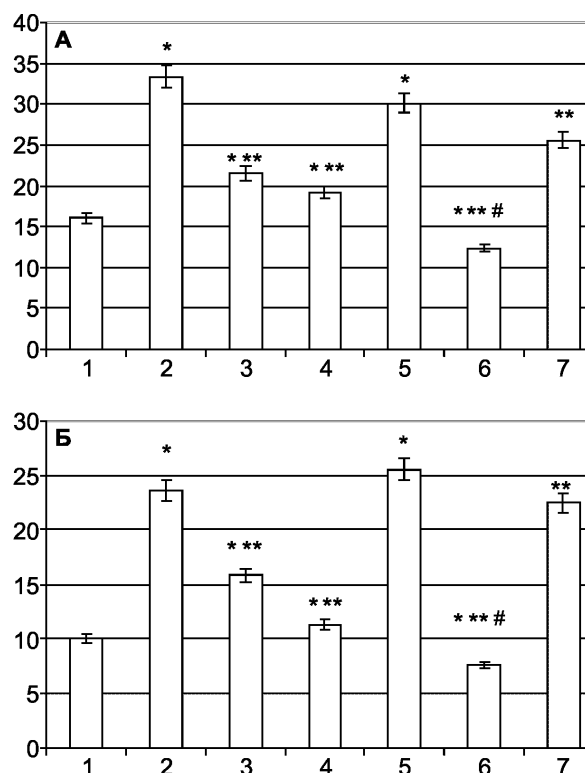
### Результаты и обсуждение

В водном тесте Морриса установлено (рисунок А, Б), что у ОЭ самок наблюдалось ухудшение процесса пространственного обучения по сравнению с группой контрольных интактных самок ( $p < 0,05$ , рисунок А, Б). Хроническое введение низкой дозы  $17\beta$ -эстрадиола ОЭ самкам в некоторой степени улучшало динамику пространственного обучения по сравнению с контрольными ОЭ самками ( $p < 0,05$ , рисунок А, Б). На фоне хронического введения RJR-2403 у ОЭ самок наблюдалось значительное улучшение показателей способности животных к выработке пространственного условного рефлекса. Так в данной группе крыс, при тестировании на 8-е сут. во время тренировочной и экспериментальной сессии, время поиска скрытой платформы было существенно ниже соответствующего показателя в контрольной группе ОЭ самок ( $p < 0,05$ , рисунок А, Б). В условиях комбинированного введения RJR-2403 и низкой дозы  $17\beta$ -эстрадиола проявлялось стимулирующее действие обоих веществ на процесс пространственного обучения. У ОЭ самок, получавших RJR-2403 в сочетании с  $17\beta$ -эстрадиолом, латентный период поиска платформы был достоверно ниже данного показателя у ОЭ самок и ОЭ самок, получавших низкую дозу  $17\beta$ -эстрадиола ( $p < 0,05$ , рисунок А, Б). В то же время, введение мекамиламина изолированно или в сочетании с  $17\beta$ -эстрадиолом самкам не меняло динамику пространственного обучения в водном тесте Морриса по сравнению с контрольными ОЭ самками.

В тесте «открытое поле» (таблица) было выявлено, что введение мекамиламина изолированно или в комбинации с  $17\beta$ -эстрадиолом не меняло общий характер поведения ОЭ самок в тесте «открытое поле». На фоне введения RJR-2403 в сочетании с  $17\beta$ -эстрадиолом происходило увеличение выраженности груминга и исследовательской активности по сравнению с контрольными группами интактных и ОЭ

крыс, а также с группой ОЭ крыс, получавших  $17\beta$ -эстрадиол.

Анализ результатов показывает, что продолжительное введение агониста или антагониста  $N\alpha 7$ -холинорецепторов в комбинации с низкой дозой  $17\beta$ -эстрадиола оказывает разнонаправленное действие на динамику пространственного обучения у ОЭ самок крыс. Так, сочетанное введение агониста  $N\alpha 7$ -холинорецепторов — RJR-2403 и  $17\beta$ -эстрадиола в низкой дозе оказывает антиамнестический эффект, т.е. нормализует процесс воспроизведения следа памяти в водном тесте Морриса у ОЭ крыс. При этом, наблюдается потенцирование позитивных



Влияние RJR-2403 и мекамиламина, введенных изолированно или в комбинации с низкой дозой  $17\beta$ -эстрадиола на пространственное обучение в водном тесте Морриса (8-й день тестирования) у овариоэктомированных самок крыс.

А — тренировочная сессия; Б — экспериментальная сессия.

Ось X — группы животных; ось Y — латентный период поиска скрытой платформы, с

\* —  $p < 0,05$ , достоверное отличие от контрольных интактных самок; \*\* —  $p < 0,05$ , достоверное отличие от ОЭ самок; # —  $p < 0,05$ , достоверное отличие от ОЭ самок, получавших низкую дозу  $17\beta$ -эстрадиола. Данные представлены в виде  $M \pm m$ , количество животных в группах —  $N=10$ .

Группы животных: 1 — интактные самки, получавшие физиологический раствор; 2 — ОЭ самки; 3 — ОЭ самки, получавшие  $17\beta$ -эстрадиол; 4 — ОЭ самки, получавшие RJR-2403; 5 — ОЭ самки, получавшие мекамиламин; 6 — ОЭ самки, получавшие RJR-2403 в комбинации с  $17\beta$ -эстрадиолом; 7 — ОЭ самки, получавшие мекамиламин в комбинации с  $17\beta$ -эстрадиолом

Влияние RJR-2403 и мекамиламина, введенных изолированно или в комбинации с низкой дозой 17 $\beta$ -эстрадиола, на поведение овариоэктомированных самок крыс в тесте «открытое поле»

Группы животных	Двигательная активность		Исследовательская активность	Эмоциональность	
	Перемещение	Вставание		Грумминг	Дефекация
Интактные самки	56,1 $\pm$ 2,8	13,1 $\pm$ 1,2	3,4 $\pm$ 0,8	2,0 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,2
Овариоэктомия (ОЭ)	62,4 $\pm$ 2,2	12,6 $\pm$ 2,0	3,2 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,2
ОЭ + 17 $\beta$ -Е2	63,2 $\pm$ 2,2	11,9 $\pm$ 2,2	3,3 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,2
ОЭ + RJR-2403	57,8 $\pm$ 2,4	12,4 $\pm$ 1,2	6,2 $\pm$ 0,4* ** #	4,9 $\pm$ 0,2* ** #	0,9 $\pm$ 0,2
ОЭ + мекамиламин	60,5 $\pm$ 2,2	10,6 $\pm$ 1,2	2,6 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,2
ОЭ + RJR-2403 + 17 $\beta$ -эстрадиол	66,5 $\pm$ 3,0	12,0 $\pm$ 0,8	6,8 $\pm$ 0,8* ** #	6,8 $\pm$ 0,2* ** #	1,2 $\pm$ 0,2
ОЭ + мекамиламин + 17 $\beta$ -эстрадиол	62,9 $\pm$ 2,6	10,2 $\pm$ 1,4	2,4 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,2

Примечание. \* —  $p < 0,05$ , достоверное отличие от контрольных интактных самок; \*\* —  $p < 0,05$ ; достоверное отличие от ОЭ самок; # —  $p < 0,05$ ; достоверное отличие от ОЭ самок, получавших низкую дозу 17 $\beta$ -эстрадиола. Данные представлены в виде  $M \pm m$ ; количество животных в группах —  $N=10$

эффектов RJR-2403 и 17 $\beta$ -эстрадиола на сохранение следа памяти у ОЭ самок. Выявленные изменения в поведенческих реакциях в тесте «открытое поле» у ОЭ самок, получавших RJR-2403 в комбинации с 17 $\beta$ -эстрадиолом, соответствуют наблюдаемому улучшению процесса пространственного обучения. Следует также отметить, что используемая доза RJR-2403 являлась так же, как и доза 17 $\beta$ -эстрадиола весьма низкой. Исходя из этого, можно предполагать, что корректирующее действие RJR-2403 реализуется именно через нейрональные  $N\alpha 7$ -холинорецепторы. Данные, полученные в тесте Морриса у ОЭ самок при комбинированном введении RJR-2403 и 17 $\beta$ -эстрадиола, позволяют говорить о триггерной роли низкой дозы 17 $\beta$ -эстрадиола в коррекции процесса пространственного обучения. Кроме того, сочетанное введение нейротропного и гормонального препаратов в низких дозах приводит к полной нормализации нарушенных процессов обучения, в отличие от их изолированного введения. В то же время, введение антагониста  $N\alpha 7$ -холинорецепторов — мекамиламина отдельно или в комбинации с 17 $\beta$ -эстрадиолом не улучшало показатели пространственного обучения у ОЭ самок.

Согласно данным литературы, активация центральных нейрональных  $N\alpha 7$ -холинорецепторов улучшает рабочую память и внимание в различных тестах у ряда лабораторных животных [11, 13, 14, 15]. Однако количество этих холинорецепторов существенно снижается при дефиците эстрогенов, тогда как на фоне применения эстрадиола у ОЭ самок существенно повышается плотность и количество  $N\alpha 7$ -холинорецепторов в головном мозге [7, 8, 12]. Доказано, что существует оптимальный уровень активности центральных холинорецепторов для адекватного восприятия и оценки поступающей информации из внешнего

мира. При этом отклонение уровня активности центральных холинорецепторов от оптимального уровня значительно нарушает приобретение и последующее воспроизведение полученной информации [3].

Можно говорить о том, что стимуляция  $N\alpha 7$ -холинорецепторов, вызываемая введением RJR-2403 на фоне параллельного применения низкой дозы 17 $\beta$ -эстрадиола, может приводить как к созданию необходимого уровня активности холинергической системы для осуществления нормального протекания условнорефлекторной деятельности. Учитывая эти сведения можно полагать, что целенаправленное совместное фармакологическое воздействие как на  $N\alpha 7$ -холинорецепторы, так и на эстрогеновые рецепторы приводит к восстановлению когнитивных процессов у ОЭ самок. Причем, по-видимому, это создает состояние сбалансированности протекания физиологических процессов как со стороны нейромедиаторной системы, так и со стороны гормональной системы.

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о позитивном эффекте стимуляции  $N\alpha 7$ -холинорецепторов на фоне введения низкой дозы 17 $\beta$ -эстрадиола на пространственное обучение при дефиците эстрогенов.

### Список литературы

1. **Бабичев В.Н.** Нейроэндокринный эффект половых гормонов // Успехи физiol. наук. — 2005. — Т. 36. — С. 54-67.
2. **Кириенблат Я.Д.** Практикум по эндокринологии. — М.: Высшая школа, 1969. — 255 с.
3. **Кругликов Р.И.** Нейрохимические механизмы обучения и памяти. Физиология поведения: Нейрофизиологические закономерности. — М.: Наука, 1986. — С. 633-698.



4. **Петров Е.С., Лазаренко Н.С., Куцевич С.В.** Влияние ограничения индивидуального опыта в раннем онтогенезе на вероятностные характеристики поведения крыс в «открытом поле» // Журн. высш. нервн. деят. — 1982. — Т. 32. — С. 347-356.
5. **Пономарев Д.Б., Виноградова Е.П.** Сравнительный анализ способности к обучению в водном тесте Морриса у крыс, различающихся по скорости выработки условного рефлекса активного избегания // Журн. высш. нервн. деят. — 2000. — Т. 50. — С. 974-981.
6. **Сапронов Н.С., Федотова Ю.О.** Гормоны гипоталамо-гипофизарно-овариальной системы и мозг. — СПб.: Формиздат, 2009. — 592 с.
7. **Centeno M.L., Henderson J.A., Francis Pau K.Y.** et al. Estradiol increases  $\alpha 7$  nicotinic receptor in serotonergic dorsal raphe and noradrenergic locus coeruleus neurons of macaques // J. Comp. Neurol. — 2006. — Vol. 497. — P. 489-501.
8. **Cordero-Erausquin M., Marubio L.M., Klink R.** et al. Nicotinic receptor function: new perspectives from knockout mice // Trends Pharmacol. Sci. — 2000. — Vol. 21. — P. 211-217.
9. **Gibbs R.B., Aggarwal P.** Estrogen and basal forebrain cholinergic neurons: implications for brain aging and Alzheimer's disease-related cognitive decline // Horm. Behav. — 1998. — Vol. 34. — P. 98-111.
10. **Koylu E., Demirgoren S., London E.D.** et al. Sex difference in up-regulation of nicotinic acetylcholine receptors in rat brain // Life Sci. — 1997. — Vol. 61 — P. 185-190.
11. **Levin E.D.** Nicotinic receptor subtypes and cognitive function // J. Neurobiol. — 2002. — Vol. 53. — P. 633-640.
12. **Miller M.M., Silver J., Billiar R.B.** Effects of gonadal steroids on the in vivo binding of [ $^{125}$ I]alphabungarotoxin to the suprachiasmatic nucleus. — 1984. — Vol. 290. — P. 67-75.
13. **Ping S.E., Trieu J., Wlodek M.E.** et al. Effects of estrogen on basal forebrain cholinergic neurons and spatial learning // J. Neurosci. Res. — 2008. — Vol. 86. — P. 1588-1598.
14. **Potter A.S., Newhouse P.A.** Effects of acute nicotine administration on behavioral inhibition in adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder // Psychopharmacol. (Berl.). — 2004. — Vol. 176. — P. 182-194.
15. **Potter A.S., Newhouse P.A.** Acute nicotine improves cognitive deficits in young adults with attention deficit/hyperactivity disorder // Pharmacol. Biochem. Behav. — 2008. — Vol. 88. — P. 407-417.

Поступила 12.12.12

Н.Я. Гильяно<sup>1</sup>, С.И. Степанов<sup>1</sup>, Л.А. Носкин<sup>1</sup>, Е.Н. Архипова<sup>2</sup>, Л.В. Коневега<sup>1</sup>

## **Исследование роли супероксида, оксида азота и ионов металлов переменной валентности в цитотоксическом эффекте перекиси водорода и бета амилоида**

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

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

На клетках нейроэндокринной опухоли крысы (линия PC 12) в культуре исследованы механизмы, определяющие цитотоксический эффект окислительного стресса и роль амилоидов в усилении последнего. Сравнительная флуориметрическая оценка цитотоксичности перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) и фрагмента бета амилоидного (A $\beta$ ) пептида 25-35 показала дозо-зависимое увеличение доли клеток с содержанием ДНК меньше 2с. Изоэффективными были концентрации 1мМ  $H_2O_2$  и 5 мкМ A $\beta$ . Цитотоксический эффект сопровождался увеличением внутриклеточного уровня супероксида ( $O_2^-$ ). Обработка клеток донором оксида азота нитрозоглютаатином (GSNO) и хелатором ионов железа о-фенантролином существенно снижала как внутриклеточный уровень  $O_2^-$  так и цитотоксический эффект, индуцированные  $H_2O_2$  и A $\beta$  25-35. Таким образом, в прямом эксперименте показана роль амилоидов в усилении окислительного стресса и участие активных кислородных радикалов в цитотоксическом эффекте A $\beta$ . Дополнительным аргументом, подтверждающим вклад окислительного стресса в цитотоксичность амилоидов, является аналогичность реакции клеток на действие окислительного агента —  $H_2O_2$  и A $\beta$ .

**Ключевые слова:** PC 12, A $\beta$  амилоид  $\beta$ ,  $H_2O_2$ , супероксид  $O_2^-$ , апоптоз, цитометрия

N.Ya. Giliano<sup>1</sup>, S.I. Stepanov<sup>1</sup>, L.A. Noskin<sup>1</sup>, E.N. Arkhipova<sup>2</sup>, L.V. Konevega<sup>1</sup>

## **Assessing of the role superoxide, nitric oxide and redox metals in cytotoxic effect of the $H_2O_2$ and amyloid- $\beta$ -protein**

<sup>1</sup> B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, 1, Orlova Roscha, Gatchina, Leningrad region, 188300 Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., 125315, Moscow, Russia

On the cells of neuroendocrine tumor of rats (line PC12) in culture was estimating of the governing mechanisms of the cytotoxicity of the oxidative stress and the role of the amyloids in increasing this stress. Using flowcytometric assessment of the cytotoxicity  $H_2O_2$  and fragment  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) peptide (25-35) has been shown the dose-dependent increasing of the quote of the cells with DNA content <2с. Isoeffective concentrations were 1 мМ  $H_2O_2$  and 5 мкМ A $\beta$ . The cytotoxicity  $H_2O_2$  and A $\beta$  were accompanig with the increasing of the intracellular level of  $O_2^-$ . The treatment of the cells GSNO (donor of NO) and o-phenantrolin (chelators of Fe ions) significantly decreased the intracellular level of  $O_2^-$  as well as the cytotoxicity  $H_2O_2$  and A $\beta$ . Thus, in direct experiments has been shown of the part amyloids in the increasing of the oxidative stress and participation of the reactive oxide radicals in the cytotoxic effect of the A $\beta$ . The addition argument which confirmed contribution of the oxidative stress in the cytotoxic effect of the A $\beta$  was the similarity of the cellular response on the action of the oxidative agent —  $H_2O_2$  and A $\beta$ .

**Key words:** PC 12, A $\beta$  amyloid  $\beta$ ,  $H_2O_2$ , superoxide  $O_2^-$ , apoptosis, cytometry

Показано, что дисфункция митохондрий и окислительный стресс играют важную роль в ранней патологии нейродегенеративных заболеваний [2, 3, 4, 10, 13, 14]. Окислительные повреждения предшествуют формированию бета амилоидных (A $\beta$ ) бляшек, являющихся одной

из патологических особенностей головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера [11, 10]. Предполагается, что реактивные кислородные и азотистые радикалы модифицируют белки либо прямо взаимодействуя с ними, либо через продукты перекисного окисления липидов. Окисленные модифицированные липиды ускоряют олигомеризацию A $\beta$  [6]. Олигомеризация A $\beta$  ассоциируется с поздней стадией развития заболевания, которая характеризуется выраженным апоптозом нейронов, массивной,

**Для корреспонденции:** Гильяно Надежда Яковлевна, д-р биол. наук, вед. научн. сотр. лаб. медицинской биофизики ФГБУ ПИЯФ им. Б.П. Константинова. E-mail: giliano@omrb.pnpi.spb.ru

прогрессирующей потерей различных популяций нейронов. При этом следует подчеркнуть, что агрегация бета-амилоидного белка не является причиной наиболее распространенной спорадической формы болезни Альцгеймера, а является лишь следствием протекания других патологических процессов, таких как окислительный стресс и воспаление. Возможно, что сам Аβ способен продуцировать свободные радикалы через генерацию  $H_2O_2$ . Кроме того, показано увеличение экспрессии индуцибельной NO-синтазы (iNOS) после обработки клеток Аβ [9]. Механизмы, определяющие роль амилоидов в увеличении окислительного стресса, как и вклад окислительного стресса в цитотоксичность амилоидов до настоящего времени окончательно не определены. В последнее время точка зрения о токсичности Аβ пересматривается на основании результатов экспериментов, показавших, что в отсутствие редоксных ионов металлов Аβ не токсичен. Более того, авторы полагают, что агрегация бета-амилоидного белка и белка тау в мозге пациентов с болезнью Альцгеймера является защитным компенсаторным процессом, направленным на восстановление функциональной активности нейронов [5, 6]. Предполагается, что определяющим фактором в развитии нейродегенеративных заболеваний является истощение антиоксидантной системы (в частности, низкий уровень глутатиона в клетках) и повышенная концентрация металлов переменной валентности [16].

**Цель работы** — выявление цитотоксичности олигомеризованного фрагмента (25-35) бета амилоида и условий, модифицирующих эффект такого олигомера. Проведено сравнительное исследование роли супероксида, оксида азота и ионов металлов переменной валентности в цитотоксическом эффекте  $H_2O_2$  и Аβ на клетки нейроэндокринной опухоли крысы (линия PC 12) в культуре.

### Методика

Клетки нейроэндокринной опухоли крысы (линии PC 12) часто используются в качестве модельной системы при исследованиях болезни Альцгеймера и Паркинсона. Показано, что PC12 синтезируют, сохраняют и секретируют допамин и ацетилхолин [12]. Клетки культивировали во флаконах Карреля на питательной среде Игла с добавлением 10% сыворотки эмбриона теленка. В качестве антибиотика при инкубации клеток в этой среде использовали гентамицин.

В качестве индуктора окислительного стресса использовали  $H_2O_2$  — реагент широко используемый в моделях *in vitro*. Показано, что в концентрациях от 0,1 до 5 мМ, он существенно снижал жизнеспособность клеток данной клеточной линии [17].

Аβ пептидный фрагмент 25-35, выдержанный 2 дня при 37°C, был любезно предоставлен В. Захаровым (лаб.биополимеров ПИЯФ, НИЦ «Курчатовский институт»). Показано, что инъекция данного

фрагмента бета-амилоидного пептида индуцирует симптомы болезни Альцгеймера у крыс [2].

Для оценки роли ионов металлов переменной валентности в питательную среду вводили водорастворимый хелатор железа — о-фенантролин (в концентрации 50 мкМ). Ранее нами было показано, что данная концентрация снижала апоптотическую гибель клеток HeLa [7].

В качестве модификатора баланса свободных радикалов использовали донор оксида азота нитрозоглутатион (GS-NO). Ранее нами было показано, что добавление 0,5 мМ GS-NO к клеткам HeLa при их инкубации в питательной среде в течение 22 ч приводило к увеличению внутриклеточной концентрации NO как минимум в 6 раз по сравнению с контро-

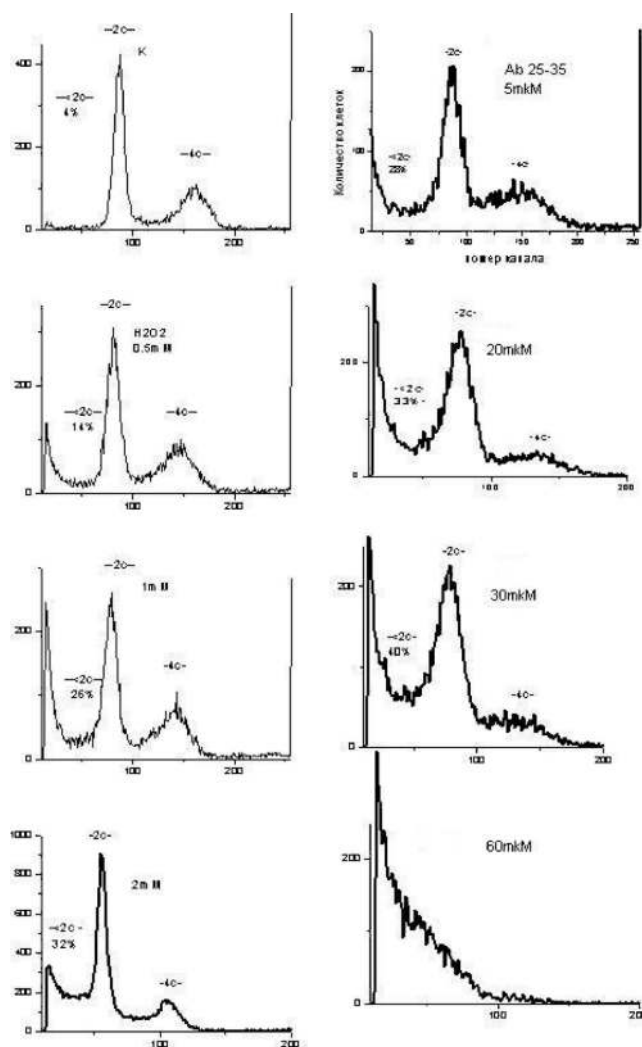


Рис. 1. Влияние различных концентраций  $H_2O_2$  (левая панель) и Аβ (25-35) (правая панель) на апоптотическую гибель клеток PC 12. Оценивалось распределение клеток по содержанию ДНК после окрашивания их бромистым этидием. По оси абсцисс — номер канала флуоресценции; по оси ординат — число клеток в отн.ед.

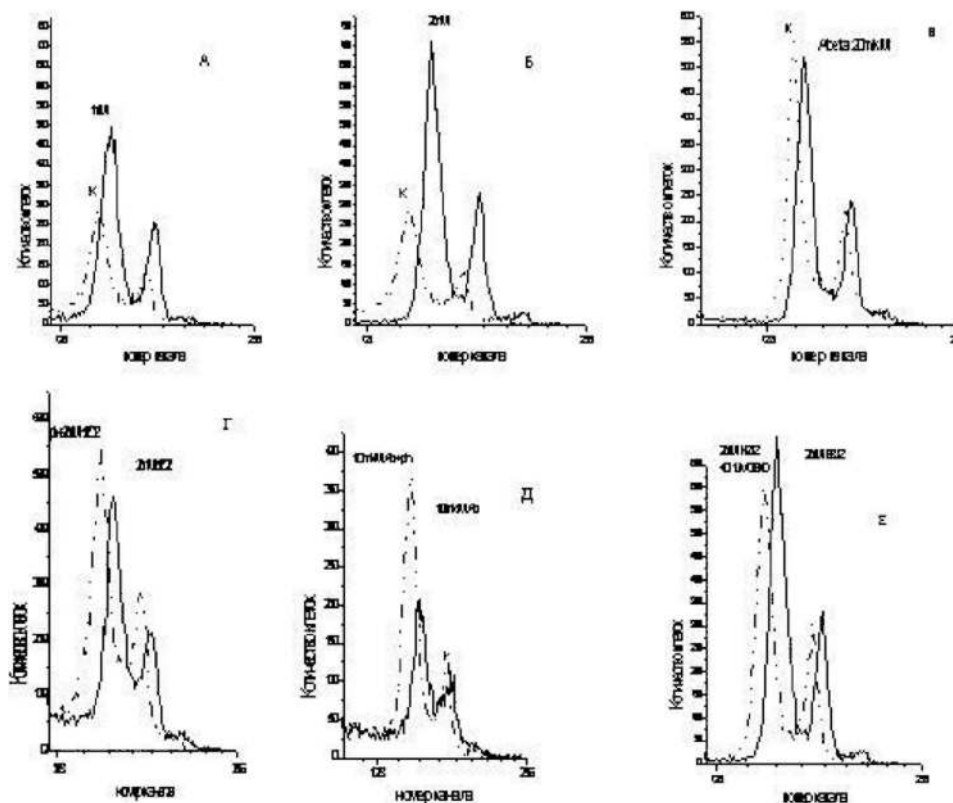


Рис. 2. Влияние  $\text{H}_2\text{O}_2$  (а и б, сплошная линия —  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; пунктирная — контроль) и  $\text{A}\beta$  (25-35) (в — сплошная линия 20 мкМ  $\text{A}\beta$ ; пунктирная — контроль) на внутриклеточный уровень супероксида и его модификация хелатором железа — о-фенантролином (г — сплошная линия  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; пунктирная — фенантролин +  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; д — сплошная линия — 10 мкМ  $\text{A}\beta$ ; пунктирная — фенантролин + 10 мкМ  $\text{A}\beta$ ) и GSNO (е — сплошная линия —  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; пунктирная — GSNO +  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). По оси абсцисс — номер канала флуоресценции (масштаб полулогарифмический  $\log_2$ ); по оси ординат — число клеток в отн.ед.

лем. При концентрации GS-NO от 0,5 мМ и выше регистрировали апоптотическую гибель клеток HeLa [7]. В данном исследовании мы использовали концентрацию GS-NO 0.1 мМ, не индуцирующую апоптотическую гибель клеток.

Для детекции внутриклеточного  $\text{O}_2^-$  использовали дигидроэтидин (DHE) (фирма «Sigma»). Клеточная суспензия инкубировалась в темноте с реактивом в конечной концентрации 5 мкМ в течение 30 мин при  $37^\circ\text{C}$ , а затем анализировалась на проточном цитометре.

Цитотоксичность  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{A}\beta$  оценивали по появлению субпопуляции клеток с содержанием ДНК меньше диплоидного набора ( $<2c$ ) при цитометрическом анализе распределения клеток по содержанию ДНК при окрашивании клеточной суспензии бромистым этидием [1].

Цитофлуориметрический анализ клеточной суспензии проводили на проточном цитометре, созданном в группе радиобиологии и медицины Петербургского Института ядерной физики. В каждой пробе анализировали не менее 20 тыс. клеток. Регистрация флуоресценции проводилась в полулогарифмическом ( $\log_2$ ) масштабе при регистрации внутриклеточного

уровня  $\text{O}_2^-$ , и в линейном масштабе при анализе распределения клеток по содержанию ДНК [1].

### Результаты и обсуждение

Результаты одного из пяти независимых экспериментов по исследованию цитотоксичности различных концентраций  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{A}\beta$  представлены на рис. 1 в виде гистограмм, характеризующих распределение клеток по содержанию ДНК. Из гистограмм видно дозозависимое увеличение доли клеток с содержанием ДНК меньше  $2c$  после 22-часовой обработки клеток как  $\text{H}_2\text{O}_2$  (левая панель), так и  $\text{A}\beta$  25-35 (правая панель). Изоэффективными были концентрации 1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  и 5 мкМ  $\text{A}\beta$ . При концентрациях 50—60 мкМ  $\text{A}\beta$  и 15—20 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  (данные не приводятся) мы регистрировали почти полный развал клеток, что согласуется с результатами других исследователей [10].

Параллельно с цитотоксичностью определяли внутриклеточный уровень супероксида, индуцированный 2-часовой обработкой клеток либо  $\text{H}_2\text{O}_2$ , либо  $\text{A}\beta$  25-35 и затем инкубированных с флуоресцентным индикатором  $\text{O}_2^-$  — дигидроэтидином. Из гистограмм, представленных на рис. 2, видно, что обработка клеток

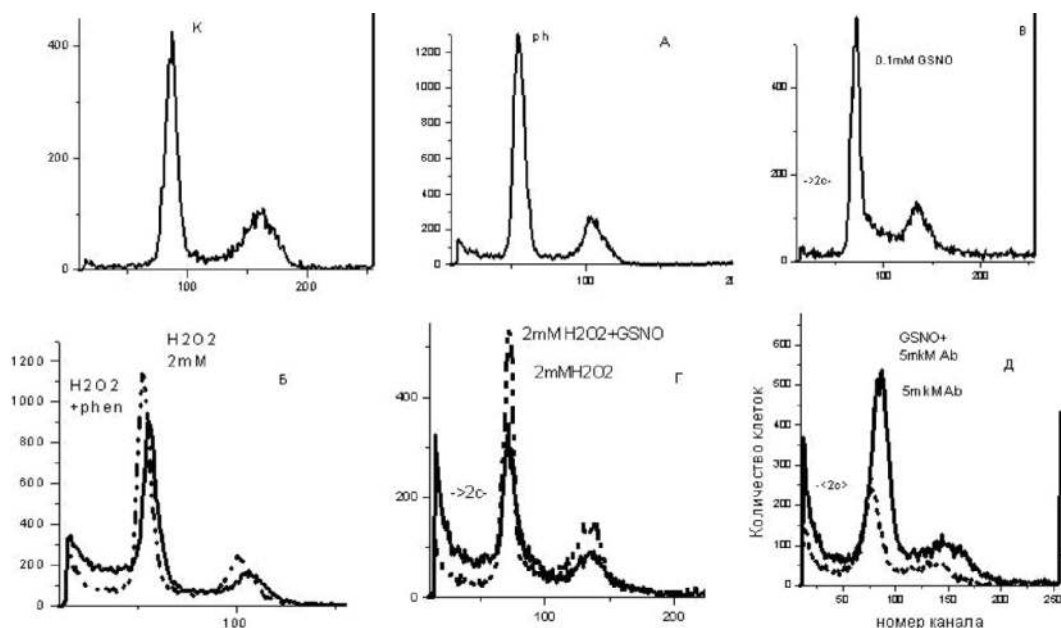


Рис. 3. Влияние о-фенантролина (А) и GSNO (В) на апоптотическую гибель клеток PC12 (верхняя панель) и апоптоз, индуцированный  $H_2O_2$  (Б, Г сплошная линия — 2 мМ  $H_2O_2$ , пунктирная линия — Б-фенантролин +  $H_2O_2$ , Г — GSNO +  $H_2O_2$ ) и Аβ (25-35) (Д, сплошная линия 5 мкМ Ab, пунктирная — GSNO + 5 мкМ Ab). По оси абсцисс — номер канала флуоресценции; по оси ординат — число клеток в отн.ед.

$H_2O_2$  приводила к увеличению интенсивности флуоресценции клеток, что соответствовало увеличению внутриклеточного уровня супероксида. Как и при оценке апоптотической гибели клеток, наблюдается зависимость от концентрации  $H_2O_2$  (рис. 2а, б).

Увеличение интенсивности флуоресценции клеток регистрировали и после обработки клеток Аβ 25-35 (рис. 2в). Генерация свободных радикалов тонко связана с участием редокс активных металлов. Редоксное состояние клетки в значительной степени связано с ионами железа (меди) и поддерживается в строгих физиологических границах. Известно, что для дисмутации  $H_2O_2$  необходимо присутствие ионов металлов переменной валентности. Мы сравнили изменение внутриклеточного уровня  $O_2^-$ , индуцированное 2 мМ  $H_2O_2$  (рис. 2г) и 10 мкМ Аβ 25-35 (рис. 2д) без хелатора ионов железа и с 50 мкМ хелатора железа — о-фенантролина. Как видно из гистограмм, обработка клеток о-фенантролином приводила к снижению интенсивности флуоресценции клеток, инкубированных как с 2 мМ  $H_2O_2$ , так и с 10 мкМ Аβ 25-35. Продукты распада  $H_2O_2$ :  $O_2^-$  и  $OH^-$  радикалы являются продуктами нормального клеточного метаболизма и при физиологических концентрациях уравновешиваются активацией внутриклеточной антиоксидантной системой защиты клеток. При изменении внутриклеточного баланса свободных радикалов активацией или ингибированием внутриклеточных процессов, вовлеченных в генерацию свободных радикалов, меняется и клеточный ответ на различные неблагоприятные воздействия. Внутриклеточный редокс потенциал может быть фактором

определяющим, расти клетке или умирать. В качестве агента, меняющего внутриклеточный баланс свободных радикалов, был использован донор NO — GSNO, широко используемый в медицинской практике препарат. Обработка клеток 0,1 мМ GSNO приводила также к снижению внутриклеточного уровня  $O_2^-$  почти до контрольного значения (рис. 2е).

Ранее нами на клетках карциномы человека (HeLa G-63) было показано, что обработка клеток GSNO повышает внутриклеточный уровень NO и снижает внутриклеточный уровень  $O_2^-$ . NO, продуцируемый GSNO, ведет себя как антиоксидант [7]. Протективный эффект GSNO от нейротоксичности Аβ продемонстрирован в ряде работ [10, 15]. Мы провели сравнительное исследование модификации о-фенантролином и GSNO цитотоксического эффекта  $H_2O_2$  и Аβ 25-35. Из гистограмм на рис. 3 видно, что сам о-фенантролин в данной концентрации не проявлял цитотоксического эффекта (рис. 3а), но существенно снижал цитотоксический эффект  $H_2O_2$ .

Обработка клеток GSNO в концентрации 0,1 мМ не индуцировала клеточной гибели (рис. 3в), но существенно снижала цитотоксический эффект как  $H_2O_2$  (рис. 3г), так и Аβ 25-35 (рис. 3д). Снижение  $H_2O_2$ -индуцированной цитотоксичности GSNO свидетельствует о том, что  $O_2^-$  является одним из цитотоксических факторов. При этом известно, что  $O_2^-$  прямо не реагирует с полипептидами, сахарами или нуклеиновыми кислотами и его способность окислять липиды спорна. В процессе реакции  $O_2^-$  дисмутирует до  $H_2O_2$  и молекулярного кислорода.

$O_2^-$  следует рассматривать как первичный кислородный радикал, способный в дальнейшем взаимодействовать с другими молекулами и генерировать вторичные кислородные радикалы. Это может быть достигнуто или прямо, или через ферментативные или металл-катализируемые процессы. Цитопротективный эффект NO от  $H_2O_2$ -индуцированной цитотоксичности приписывается перехвату радикалов и восстановлению митохондриального дыхания. Показано также, что GSNO снижает нейротоксичность через ингибирование активации каспаз и реактивных кислородных радикалов [8, 15]. GSNO как стабилизатор и переносчик NO может проявлять протекторный эффект и за счет реакций транснаитрозилирования. Предполагается, что гомеостаз систем NO, GSNO, глутатиона и тиоредоксина является важным для защиты от окислительного стресса и апоптоза при нейродегенеративных заболеваниях. Полученные результаты также подтверждают точку зрения о взаимосвязи окислительного стресса с уровнем железа в клетках мозга, зарегистрированных при болезни Альцгеймера [9].

Таким образом, в прямом эксперименте показана роль бета-амилоидов (фрагмента 25-35) в увеличении окислительного стресса и участие активных кислородных радикалов (супероксида и  $H_2O_2$ ) в цитотоксическом эффекте Аβ. Дополнительным аргументом, подтверждающим вклад окислительного стресса в цитотоксичность амилоидов, является аналогичность реакции клеток на действие окислительного агента —  $H_2O_2$  и Аβ. При этом следует отметить, что нейродегенеративные заболевания это мультифакторные заболевания и причины гибели нейронов могут зависеть и от других факторов, но несомненно, что нарушения редоксного гомеостаза вносят свой существенный вклад в развитие данных заболеваний.

Работа частично поддержана грантом РФФИ (12.04.00327а)

### Список литературы

1. Гильяно Н.Я., Конева Л.В., Носкин Л.А. Модификация внутриклеточного уровня свободных радикалов и апоптоз в эндотелиоцитах и клетках карциномы человека в культуре // Бюллетень Экспериментальной Биологии и Медицины. — 2010. — Т. 150, №11. — С. 578-589.
2. Гуляева Н.В., Степанов М.Ю., Моисеева Ю.В. Изменения пролиферации клеток в субвентрикулярной зоне

мозга у взрослых крыс при введении бета-амилоидного пептида (25-35) // Нейрохимия. — 2002. — №3. — С. 165-175.

3. Almeida S., Sarmento-Ribeiro A.B., Januario C. et al. Evidence of apoptosis and mitochondrial abnormalities in peripheral blood cells of Huntington's disease patients // Biochem & Biophysical Research Communications. — 2008. — Vol. 374. — P. 599-603.
4. Bisaglia M., Sarino M.E., Arduini I. et al. Molecular characterization of dopamine-derived quinones reactivity toward NADH and glutathione: implications for mitochondrial dysfunction in Parkinson disease // Biochimica et Biophysica Acta. — 2010. — Vol. 1802. — P. 699-706.
5. Castellani R.J., Lee H.G., Perry G. et al. Antioxidant protection and neurodegenerative disease: the role of amyloid-beta and tau // Am. J. Alzheimers. Dis. Other Dement. — 2006. — Vol. 21, №2. — P. 126-130.
6. Castellani R.J., Lee H.G., Siedlak S.L. et al. Reexamining Alzheimer's disease: evidence for a protective role for amyloid-beta protein precursor and amyloid-beta // J. Alzheimers Dis. — 2009. — Vol. 18, №2. — P. 447-452.
7. Giliano N.J., Konevega L.V., Noskin L.A. et al. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands and apoptosis: studies with HeLa cell cultures // Nitric Oxide. — 2011. — Vol. 24, №3. — P. 151-159.
8. Hung Y.H., Bush A., Cherny R.A. Copper in the brain and Alzheimer's disease // J. Biol. Inorg. Chem. — 2010. — Vol. 15. — P. 61-76.
9. Jomova K., Vondrakova D., Lawson M. et al. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders // Mol. Cell Biochem. — 2010. — Vol. 345. — P. 91-104.
10. Ju T.C., Chen S.D., Liu C.C. et al. Protective effects of S-nitrosoglutathione against amyloid beta-peptide neurotoxicity // Free Radic. Biol. Med. — 2005. — Vol. 38, №7. — P. 938-949.
11. Kimura C., Oike M., Watanabe M. et al. Proapoptotic nitric oxide production in amyloid beta protein-treated cerebral microvascular endothelial cells // Microcirculation. — 2007. — Vol. 14, №2. — P. 89-97.
12. Melega W.P., Howard B.D. Choline and acetylcholine metabolism in PC12 secretory cells // Biochemistry. — 1981. — Vol. 20, №15. — P. 4477-4478.
13. Moreira P.I., Carvalho C., Zhu X. et al. Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology // Biochimica et Biophysica Acta. — 2010. — Vol. 1802. — P. 2-10.
14. Pimplikar S.W. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease // Int. J. Biochem. Cell Biol. — 2009. — Vol. 41. — P. 1261-1268.
15. Rauhala P., Andoh T., Chiueh C.C. Neuroprotective properties of nitric oxide and S-nitrosoglutathione // Toxicol. Appl. Pharmacol. — 2005. — Vol. 207 (2 Suppl.). — P. 91-95.
16. Valko M., Morris H., Cronin M.T. Metals, toxicity and oxidative stress // Curr. Med. Chem. — 2005. — Vol. 11. — P. 1161-1208.
17. Zhang Shi-Ping, Du Xin-Gang, Pu Xiao-Ping. 3-O-demethylswertipunicoside protects against oxidative toxicity in PC12 cells // Biol. Pharm. Bull. — 2010. — Vol. 33, №9. — P. 1529-1533.

Поступила 14.05.13

### Сведения об авторах:

- Степанов Сергей Иванович, науч. сотр. лаб. медицинской биофизики, ФГБУ ПИЯФ им. Б.П. Константинова  
 Носкин Леонид Алексеевич, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. медицинской биофизики ФГБУ ПИЯФ им. Б.П. Константинова  
 Архипова Елена Николаевна, и.о. старш. науч. сотр. ФГБУ «НИИОПП» РАМН  
 Конева Леонид Владимирович, канд. биол. наук, старш. научн. сотр. лаб.молекулярной генетики ФГБУ ПИЯФ им. Б.П. Константинова

А.Ю. Сбоев, В.Т. Долгих, В.И. Ларькин

## **Значимые факторы, влияющие на мозговое кровообращение у пациентов с опухолями головного мозга супратенториальной локализации**

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

Омская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения Российской Федерации, 644043, Омск, ул. Ленина, 12

*Методом ультразвуковой доплерографии изучено мозговое кровообращение у 90 пациентов с опухолями головного мозга супратенториальной локализации (опухоль глиального ряда — 43 чел., менингиомы — 34 чел., метастатическое поражение — 9 чел.) в дооперационном периоде. Факторами, изменяющими мозговое кровообращение у пациентов с супратенториальными опухолями, явились смещение срединно-стволовых структур, увеличение внутричерепного давления, гистологическая структура и длительность от появления первых симптомов болезни. Локализация (за исключением затылочной доли) и размер опухоли непосредственно не оказывали влияния на параметры кровообращения.*

**Ключевые слова:** опухоли головного мозга, доплерография

A.Yu. Sboev, V.T. Dolgih, V.I. Larkin

## **Factors significant for cerebral circulation in patients with supratentorial brain tumors**

Omsk State Medical Academy, 12, Lenin street, Omsk, 644043

*Using the Doppler ultrasonography method the condition of brain blood circulation of 90 patients with supratentorial brain tumors (gliomas — 43, meningiomas — 34, metastasis — 9) during pre-surgical period was studied. The factors changing brain blood circulation at patients with with supratentorial brain tumors were brain displacement, increase of intracranial pressure, histologic structure and the first symptoms duration of illness. Localization (for an exception of an occipital lobe) and the size of a tumor directly didn't render influence on blood circulation parameters.*

**Keys words:** brain tumors, Doppler ultrasonography

Опухоли головного мозга являются значимой онкологической проблемой в связи с тяжелыми медико-социальными последствиями этой патологии [5, 6]. Рост опухоли сопровождается перестройкой мозгового кровообращения, что влияет на клинические проявления болезни [2].

*Цель работы* — выявление наиболее значимых патогенетических факторов, влияющих на мозговое кровообращение у пациентов с опухолями головного мозга супратенториальной локализации, как наиболее частой локализации патологического процесса.

### **Методика**

Основная группа включала 90 пациентов с опухолями головного мозга супратенториальной локализации, сформированная методом случайной выборки из больных, поступавших в плановом порядке и в поряд-

ке неотложной помощи в клинику нейрохирургии Омской областной клинической больницы.

*Критерии включения в группу:* возраст 20—60 лет, больные, находившиеся на лечении в нейрохирургическом отделении с диагнозом опухоли головного мозга супратенториальной локализации, добровольное информированное согласие пациента на участие в проведении исследования, наличие доступных ультразвуковых окон.

*Критерии исключения:* больные с ЧСС менее 60 мин<sup>-1</sup> и более 90 мин<sup>-1</sup> в момент проведения исследования; больные с АД менее 90/60 и более 180/100 мм рт. ст.; больные с гемодинамически значимыми препятствиями кровотоку в магистральных артериях шеи и церебральных артериях; отказ пациента от дальнейшего участия в исследовании и несоблюдение пациентом требований протокола исследования.

В группу вошло 39 мужчин (43,3%) и 51 женщина (56,7%), средний возраст 43,5±12,2 лет (M±δ).

**Для корреспонденции:** Сбоев Антон Юрьевич, асп. каф. патофизиологии с курсом клинической патофизиологии ГБОУ ВПО «ОмГМА» Минздрава. E-mail: sboev\_anton@mail.ru

Распределение больных в зависимости от гистологической структуры опухоли: глиальные опухоли 43 чел. (47,8%), менингиомы — 34 чел. (37,7%), метастатическое поражение головного мозга — 9 чел. (10%), гистологическая структура опухоли была не известна у 4 пациентов (4,5%). В зависимости от размера опухоли выделяли следующие категории: небольшие (менее 4 см) — у 24 чел. (26,7%), от 4 до 6 см (средние) — у 38 чел. (42,2%), более 6 см (большие) — у 28 чел. (31,1%). Опухоли занимали различные отделы больших полушарий головного мозга. Опухоли в подавляющем большинстве случаев локализовались латерально или парамедиально. Смещение срединно-стволовых структур отмечено у 56 пациентов основной группы.

В контрольную группу вошло 50 чел. (средний возраст  $42,6 \pm 12,7$  года;  $M \pm \delta$ ) без патологии сосудистой системы. Большую часть контрольной группы составили пациенты с дискогенной радикулопатией на поясничном уровне. Среди сопутствующей патологии также были артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца и сахарный диабет 2 типа. Процент сопутствующих заболеваний у лиц контрольной группы соответствовал основной группе.

Мозговое кровообращение исследовали методом ультразвуковой доплерографии за 1—2 сут. до оперативного лечения, либо в первые дни госпитализации (если оперативное лечение не проводилось). С целью исключения пациентов с гемодинамически значимыми поражениями магистральных артерий выполняли дуплексное сканирование брахиоцефальных артерий. Верификацию опухоли осуществляли методом компьютерной томографии, магнитно-резонансной томографии и по данным гистологического исследования [9]. Исследования проводились на аппарате «Ангиодин-У» (НПФ «Биос», Россия). Регистрировали среднюю скорость кровотока в магистральных артериях шеи (общей и внутренней сонной и позвоночных артериях) и основных интракраниальных артериях (передней, средней и задней мозговых; основной и интракраниальных отделах позвоночных артерий). Оценивали индексы, характеризующие амплитудные соотношения скоростей кровотока: пульсативный [8] и индекс сопротивления [12]. Для оценки периферического сопротивления экстракраниальных сосудов рассчитывали индекс периферического сопротивления, а для интракраниальных — пульсативный индекс, как показатели, наиболее информативные для данной локализации опухоли [3]. Для оценки миогенного контура ауторегуляции мозгового кровотока выполняли каротидно-компрессионную пробу [4]. Ни у одного из обследованных эта проба не вызвала нарушений самочувствия. Для оценки метаболической регуляции мозгового кровотока использовали гипо-

гиперкапническую пробу. Для обобщенной оценки вазомоторной реактивности, учитывающей как дилаторный, так и констрикторный резервы сосудов мозга использовался индекс вазомоторной реактивности [4]. Проводилась оценка влияния размера, гистологической структуры, локализации опухоли, наличия смещения срединно-стволовых структур, застоя на глазном дне, длительности заболевания с момента манифестации на исследуемые показатели мозгового кровообращения. Математическая обработка полученных результатов проводилась на ПЭВМ типа IBM PC/AT с использованием программы «Statistica 6.0». Для принятия решения о характере распределения использовался критерий Шапиро—Уилка. Распределение исследуемых величин соответствовало нормальному. Для сравнения групп данных использовали t-критерий Стьюдента. Различия между показателями считали достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Смещения срединно-стволовых структур приводило к повышению средней скорости кровотока в позвоночной артерии на интактной стороне с увеличением пульсативного индекса в интракраниальном отделе позвоночных артерий с двух сторон (табл. 1). Коэффициент овершута на «здоровой» стороне у пациентов со смещением ( $1,29 \pm 0,13$ ;  $n=56$ ) был достоверно выше, чем у пациентов без смещения ( $1,22 \pm 0,10$ ;  $n=32$ ). Выявлена корреляционная связь между смещением срединно-стволовых структур и индексом вазомоторной реактивности (коэф. Спирмена 0,30;  $p < 0,05$ ). С увеличением смещения реактивность на стороне опухоли снижалась.

Влияние смещения срединно-стволовых структур на линейные скоростные показатели установлено нами впервые. Связь смещения срединно-стволовых структур и нарушения реактивности церебральных артерий в литературе была представлена в ряде работ. Так, Y. Nakayama с соавторами было установлено, что цереброваскулярная реактивность в ответ на гиперкапническую нагрузку (ацетозоламид) в дооперационном периоде снижена у пациентов с масс-эффектом [10]. Показано также, что цереброваскулярная реактивность уменьшалась по мере нарастания перитуморального отека, что предполагает рост смещения срединно-стволовых структур [7]. По данным нашего исследования, смещение срединно-стволовых структур способствует вазоспастическим реакциям в условно интактном полушарии, на что указывает повышение коэффициента овершута на непораженной опухолью стороне, в сравнении со стороной опухолевого процесса.

Пульсативный индекс в средней мозговой артерии у пациентов с отеком глазного дна ( $0,96 \pm 0,17$ ;  $n=76$ , показатели пораженной и здоровой стороной объеди-



Таблица 1

## Средняя скорость кровотока и пульсативный индекс позвоночных артерий при наличии и отсутствии смещения срединно-стволовых структур мозга (M±SD)

Область исследования	Средняя скорость кровотока			Пульсативный индекс		
	Смещение		Контроль (n=50)	Смещение		Контроль (n=50)
	Есть (n=58)	Нет (n=32)		Есть (n=58)	Нет (n=32)	
Сторона опухоли	22,7±6,7	21,5±6,8	21,2±6,0	0,93±0,25*	0,84±0,16	0,83±0,18
Здоровая сторона	26,4±6,2*	18,2±7,6		0,93±0,24*	0,84±0,22	

Примечание. \* —  $p < 0,05$  в сравнении с контролем

Таблица 2

## Индексы резистентности средней мозговой артерии при глиомах и менингиомах (M±SD)

Область исследования	Глиомы (n=43)	Менингиомы (n=34)
Сторона опухоли	0,89±0,15	0,96±0,14*
Здоровая сторона	0,91±0,17	0,92±0,17

Примечание. \* —  $p < 0,05$  в сравнении с подгруппой глиальных опухолей.

Таблица 3

## Средняя скорость кровотока и коэффициент асимметрии у пациентов с опухолями затылочной локализации (M±SD)

Область исследования	Позвоночная артерия (n=11)	Задняя мозговая артерия (n=11)
Сторона опухоли	31,4±7,3*	46,3±12,1*
Здоровая сторона	23,4±6,4	32,5±13,1
Контроль	21,2±6,0	36,9±9,1

Примечание. \* —  $p < 0,05$  в сравнении с контролем

нены) был значимо выше ( $p=0,01$ ), чем у пациентов без отека ( $0,87±0,18$ ,  $n=104$ ). Наличие отека глазного дна свидетельствует о повышении внутричерепного давления. Это согласуется с данными других авторов о повышении периферического сопротивления при увеличении внутричерепного давления [1, 4].

Гистологическая структура опухоли соответствовала характерной картине мозгового кровообращения у больных. У пациентов с менингеальными опухолями отмечены более высокие индексы сопротивления в средней мозговой артерии на стороне опухоли (табл. 2). В то же время скоростные параметры кровообращения у больных с менингиомами и глиомами значимо не отличались.

Реакция сосудов головного мозга на изменение содержания углекислоты зависела от гистологической природы опухоли. При глиомах нарушение метаболической реактивности выявлялось чаще, и показатели реактивности на метаболический стимул имели более низкие значения в сравнении с менингиомами.

При сравнении групп пациентов, имевших опухоли одной гистологической структуры, коэффициент реактивности на гиперкапническую нагрузку у пациентов с глиомами на стороне опухоли ( $1,13±0,22$ ;  $n=43$ ) оказался достоверно ниже, чем у пациентов с менингиомами ( $1,24±0,19$ ;  $n=34$ ). Также более низкие значения индекса вазомоторной реактивности были у па-

циентов с глиальной опухолью в сравнении с менингиомами, что, по-видимому, в большей мере связано со снижением реактивности на гиперкапнические стимулы. Все пациенты с метастатическим поражением ( $n=9$ ) имели значительное снижение коэффициента реактивности на гиперкапническую нагрузку (с двух сторон — 4, на стороне опухоли — 3, на противоположной стороне — 2).

Нами не выявлено зависимости между опухолями, расположенными в лобной, теменной, височных долях, и скоростью кровотока в исследуемых артериях. Влияние расположения опухоли на показатели кровообращения отмечено только в отношении затылочной локализации. При расположении опухоли в затылочной доле выявлено увеличение скоростных показателей в позвоночной артерии и задней мозговой артерии на стороне опухоли (табл. 3).

При сравнении параметров кровотока с размерами опухоли статистически значимых связей не выявлено (коэф. Спирмена  $< 0,2$ ;  $p > 0,05$ ). Отсутствие влияния размера опухоли на показатели кровообращения головного мозга может быть объяснено относительно медленным развитием опухолевого процесса и возможностью включения компенсаторных механизмов. В целом, большинством авторов также не отмечено существенного влияния размера опухоли на мозговой кровоток [11].

Длительность заболевания статистически значимо коррелировала со снижением коэффициента овершута как на пораженной стороне (коэф. Спирмена  $-0,35$ ,  $p < 0,01$ ), так и интактной (коэф. Спирмена  $-0,29$ ;  $p < 0,01$ ). Следует отметить, что длительное течение болезни не приводило к кардинальным изменениям мозгового кровообращения, что лишний раз свидетельствует о высоких компенсаторных возможностях организма в случае постепенного развития патологического процесса.

Таким образом, факторами, изменяющими мозговое кровообращение у пациентов с супратенториальными опухолями, являлись, во-первых, смещение срединно-стволовых структур, во-вторых, увеличение внутричерепного давления, в-третьих, гистологическая структура и, в-четвертых, продолжительность заболевания от появления первых симптомов болезни. Такие значимые анатомические особенности, как локализация (за исключением затылочной доли) и размер опухоли непосредственно не оказывали влияния на параметры кровообращения. Их влияние реализовывалось через описанные выше общие патогенетические факторы.

#### Список литературы

1. **Белкин А.А., Алашеев А.М., Инюшкин С.Н.** Транскраниальная доплерография в интенсивной терапии. Методическое руководство для врачей. — Екатеринбург, 2006. — 103 с.
2. **Вакатов Д.В.** Опухоли головного мозга супратенториальной локализации у лиц пожилого и старческого возраста: Автореф. дисс. на соискание учёной степени к.м.н. — М., 2006. — 24 с.
3. **Лелюк В.Г., Лелюк С.Э.** Ультразвуковая ангиология. — М.: Реальное Время, 1999. — 288 с.

4. **Свистов Д.В., Парфенов В.Е.** Полуколичественная доплерографическая оценка ауторегуляции кровоснабжения головного мозга в норме и при нейрохирургической патологии // Вопросы нейрохирургии. — 1998. — №1. — С. 28-34.

5. **Улитин А.Ю.** Эпидемиология первичных опухолей головного мозга среди населения крупного города и пути совершенствования организации медицинской помощи больным с данной патологией (на модели Санкт-Петербурга): Автореф. дисс. на соискание учёной степени к.м.н. — СПб., 1997. — 23 с.

6. **De Vita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A.** Cancer: Principles and Practice of Oncology — 4<sup>th</sup> ed. — Philadelphia: J.B. Lippincott, 1993. — P. 1679-1738.

7. **Chang C.C., Kuwana N., Ito S.** et al. Effects of peritumoural oedema on cerebral blood flow and cerebrovascular reactivity in patients with alert consciousness // Eur. J. Nuclear Medicine. — 1999. — Vol. 26, №11. — P. 1493-1496.

8. **Gosling R.G., King D.H.** Arterial assessment by Doppler-shift ultrasound // Proc. Roy Soc. Med. — 1974. — Vol. 67. — P. 447-449.

9. **Kleihouse P., Cavanee W.K.** World Health Organization. Classifications of Tumors: Tumors of the Nervous System — Pathology and Genetics. — Lyon, France: IARC Press. 2000. — 314 p.

10. **Nakayama Y., Tanaka A., Kumate S., Yoshinaga S.** Cerebral blood flow in normal brain tissue of patients with intracranial tumors // Neurol Med Chir. — 1996. — Vol. 36, №10. — P. 709-714.

11. **Toglia A., Kittelson J.M., Roemer R.B.** et al. Cerebral blood flow in and around spontaneous malignant gliomas // . — 1996. — Vol. 12, №4. — P. 461-476.

12. **Ursino M., Giulioni M., Lodi C.A.** Relationships among cerebral perfusion pressure, autoregulation, and transcranial Doppler waveform: a modeling study // J. Neurosurg. — 1998. — Vol. 89. — P. 255-266.

Поступила 03.02.12

#### Сведения об авторах:

**Долгих Владимир Терентьевич**, д-р мед. наук, засл. деятель науки РФ, проф., зав. каф. патофизиологии с курсом клинической патофизиологии, ГБОУ ВПО «ОмГМА» Минздрава

**Ларькин Валерий Иванович**, д-р мед. наук, зав. каф. неврологии и нейрохирургии с курсом медицинской генетики ГБОУ ВПО «ОмГМА» Минздрава

А.В. Сидоров, М.М. Фатеев

## Липидный спектр крови и выживаемость крыс с сердечной недостаточностью различной тяжести при введении нейрогормональных модуляторов

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования  
Ярославская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
150000, г.Ярославль, ул. Революционная, 5

У крыс с относительно легкой степенью хронической сердечной недостаточности (ХСН) уровень ЛПНП в крови был повышен. В свою очередь, при тяжелой ХСН выявлялось значимое уменьшение концентрации общего холестерина за счет ЛПНП. Ингибиторы АПФ (каптоприл, эналаприл, лизиноприл) и наиболее селективные блокаторы  $\beta_1$ -адренорецепторов (метопролол, небиволол) не оказывали существенного влияния на липидный спектр крови. Менее избирательный (атенолол) и, особенно, неселективные (карведилол, пиндолол, пропранолол)  $\beta$ -адреноблокаторы повышали атерогенный потенциал плазмы вследствие значимого уменьшения концентрации ЛПВП при легкой ХСН, а на осложненной модели — из-за тенденции к снижению уровня ЛПВП и повышению содержания ЛПНП. Липофильные ингибиторы АПФ и  $\beta$ -адреноблокаторы без внутренней симпатомиметической активности в равной степени повышали выживаемость крыс с легкой ХСН, а при тяжелом ее варианте  $\beta$ -адреноблокаторы, особенно неселективные, имели преимущество над ингибиторами АПФ.

**Ключевые слова:** хроническая сердечная недостаточность, липидный спектр, выживаемость,  $\beta$ -адреноблокаторы, ингибиторы АПФ

A.V. Sidorov, M.M. Fateev

## Plasma lipid spectrum and survival in rats with heart failure varied by severity under the influence of neurohormonal modulators

Yaroslavl Medical State Academy, 5, Revolutsionnaya str., Yaroslavl, 150000, Russia

In rats with relatively mild chronic heart failure (CHF) there was an increase in plasma LDL levels. In turn, in severe CHF it was revealed a significant decrease in total cholesterol concentration due to LDL levels decline. ACE inhibitors (captopril, enalapril and lisinopril) and the most selective  $\beta_1$ -adrenoblockers (metoprolol, nebivolol) had not any significant influence on plasma lipids. Less selective and especially nonselective  $\beta$ -adrenoblockers pindolol and propranolol brought up the atherogenic potential of plasma because of HDL levels reduction in mild CHF whereas in case of severe model — due to the trends toward decrease in HDL concentration and toward increase in LDL levels. Lipophilic ACE-inhibitors and  $\beta$ -adrenoblockers without intrinsic sympathomimetic activity improved survival in rats with mild CHF to the equal extent. On the contrary in severe CHF  $\beta$ -adrenoblockers, especially non-selective, had an advantage over ACE inhibitors on the survival effect.

**Key words:** chronic heart failure, plasma lipids, survival,  $\beta$ -adrenoblockers, ACE inhibitors

Работа посвящена исследованию липидного спектра крови крыс с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) различной тяжести, а также выяснению характера влияния на него нейрогормональных модуляторов — ингибиторов АПФ и  $\beta$ -адреноблокаторов, применяющихся в терапии ХСН, в соотношении с выживаемостью подопытных животных. Предпосылками к исследованию явились результаты

работ [5—7], демонстрирующих существование парадоксальной отрицательной корреляции между уровнем атерогенного холестерина и смертностью больных с ХСН. Влияние на липидный спектр ингибиторов АПФ и, особенно,  $\beta$ -адреноблокаторов при ХСН изучено мало.

### Методика

Проведено две серии опытов на 400 белых крысах. ХСН бивентрикулярного типа моделировалась по методике Н.Н. Пятницкого и Ю.А. Блинкова [3] в нашей модификации [4] посредством двукратного

Для корреспонденции: Фатеев Михаил Михайлович, д-р биол. наук, проф. каф. нормальной физиологии ГБОУ ВПО ЯГМА Минздрава РФ. E-mail: fateev52@mail.ru

дозированного внутриплеврального введения силиконового масла. После формирования подтвержденной гемодинамическими исследованиями ХСН крысам обеих серий ежедневно внутривентрикулярно в виде раствора вводились исследуемые препараты в дозах мг/кг [1]: каптоприл (6,3), лизиноприл (0,8), эналаприл (1,7), атенолол (8,4), метопролол (16,8), небиволол (0,8), пиндолол (2,5), пропранолол (11,8) и дополнительно во второй серии карведилол (4,2). Введение препаратов продолжали до естественной гибели животных. Крысам 2-й серии с целью обострения ХСН через 2 и 4 мес. от начала лечения дополнительно дозированно вводили внутриплеврально силиконовое масло, воспроизводившие. Определяли медиану выживаемости — период времени (в сут.), за который погибло 50% крыс в группе. Исходно в каждой группе было по 20 животных. В обеих сериях имелась группа контрольных (с ХСН без лечения,  $n=20$ ) и интактных ( $n=10$ ) крыс. Кровь для исследования забирали из хвостовой вены крыс: в 1-й серии — на 91-е сут. лечения, а во 2-й — через сутки после индуцирования второго обострения ХСН (122-й день). Концентрацию общего холестерина и его фракций (ммоль/л) в липопротеидах высокой, низкой и очень низкой плотности (ЛПВП, ЛПНП и ЛПОНП) определяли ферментативным колориметрическим методом с помощью стандартных наборов («Human», Германия). Коэффициент атерогенности плазмы крови ( $K_a$ ) рассчитывали по А.Н. Климову [2]. Результаты обрабатывали в программе «Statistica 10.0». Использовался критерий Крускала—Уоллиса. Данные в таблицах представлены в виде медианы с интерквартильным размахом.

### Результаты и обсуждение

У контрольных крыс с относительно стабильным течением ХСН на 91-е сут. отмечалось существенное (на 24% по отношению к интактным) возрастание концентрации ЛПНП (табл. 1). На фоне ингибиторов АПФ липидный спектр в сравнении с контролем существенно не различался.  $\beta$ -адреноблокаторы: атенолол, пропранолол и пиндолол способствовали снижению уровня ЛПВП в среднем на 22—29% по отношению к контролю, а также на 18—30% в сравнении с метопрололом и ингибиторами АПФ, значимо не влиявшими на данный показатель. Небиволол также не вызывал существенного изменения содержания ЛПВП, но единственный из  $\beta$ -адреноблокаторов приводил к снижению концентрации ЛПОНП на 23% по отношению к контролю и на 21—29% в сравнении с метопрололом, пропранололом и ингибиторами АПФ. На уровень общего холестерина и ЛПНП  $\beta$ -адреноблокаторы значимо не влияли. В итоге  $K_a$  на фоне неизбирательных  $\beta$ -адреноблока-

торов пиндолола и пропранолола возрастал соответственно на 26 и 37% по отношению к контролю, а при действии остальных препаратов не отличался статистически значимо от контроля. Под влиянием неизбирательных  $\beta$ -адреноблокаторов  $K_a$  был на 30—40% выше, чем в группе метопролола, и на 26—46% по сравнению с ингибиторами АПФ. Атенолол и небиволол повышали  $K_a$  в сравнении с каптоприлом на 22%. Медиана выживаемости крыс со стабильно протекавшей ХСН увеличилась на фоне лечения на 57—99-е сут. по отношению к контролю. Исключение составляли гидрофильный ингибитор АПФ лизиноприл и  $\beta$ -адреноблокатор с внутренней симпатомиметической активностью (ВСА) пиндолол, значимо не влиявшие на время жизни крыс.

ХСН с индуцированными обострениями (2-я серия), сопровождалась высокой смертностью животных и иными, нежели более легкий ее вариант, изменениями липидного спектра (табл. 2). В контроле отмечалось выраженное уменьшение концентрации общего холестерина на 27% по отношению к интактным за счет ЛПНП, уровень которых падал на 50%. Это привело к значимому снижению  $K_a$  плазмы на 39%. Изменения, выявленные нами при ХСН неатеросклеротического генеза, в совокупности с результатами клинических исследований, выполненных на пациентах с ишемической этиологией ХСН [5—7], позволяют предположить, что сдвиги в липидном спектре при прогрессировании данной патологии, независимо от ее первопричины, возникают, вероятно, вследствие дисфункции заинтересованных органов (кишечник, печень).

Ингибиторы АПФ при тяжелой ХСН, как и при более легком ее варианте, не оказали существенного влияния на липидный спектр крови. При введении  $\beta$ -адреноблокаторов значимых изменений в сравнении с контролем также не выявлялось. Однако из-за тенденции к повышению уровня общего холестерина на фоне неселективных препаратов карведилола, пиндолола и пропранолола переставал значимо различаться с интактными. Под влиянием карведилола его содержание становилось на 13—17% выше, чем при введении кардиоселективных  $\beta$ -адреноблокаторов и эналаприла. Концентрация общего холестерина на фоне неизбирательных  $\beta$ -адреноблокаторов возросла, в основном, за счет ЛПНП, уровень которых (как и в группе атенолола) становился статистически схожим с интактной группой. Кроме того, под влиянием неселективных  $\beta$ -адреноблокаторов концентрация ЛПНП повышалась на 18—47% в сравнении с ингибиторами АПФ. В свою очередь, на фоне наиболее селективного блокатора  $\beta_1$ -адренорецепторов небиволола уровень ЛПОНП был на 25—29% ниже, чем при введении препаратов неизбирательного действия.

Таблица 1

Липидный спектр плазмы крови (ммоль/л) и коэффициент атерогенности ( $K_a$ ) на 91-й день относительно стабильного течения хронической сердечной недостаточности и медиана выживаемости (дни)

Группа	Общий холестерин	Фракции холестерина			$K_a$	Медиана выживаемости
		ЛПВП	ЛПНП	ЛПОНП		
Интактные (n=10)	1,94 (1,83;2,07)	0,41 (0,39;0,49)	1,01 (0,90;1,09)	0,51 (0,46;0,54)	3,62 (3,16;3,92)	
Контроль (n=19)	2,22 (2,10;2,37)	0,42 (0,39;0,46)	1,25 (1,14;1,36) *	0,53 (0,51;0,62)	4,34 (3,95;4,60)	164 (128;204)
Каптоприл (n=20)	2,19 (1,99;2,35)	0,43 (0,39;0,45) $a^3/n/o^3/v^3$	1,22 (1,15;1,32) *	0,53 (0,42;0,62) n	4,07 (3,81;4,47) $a/n/o^3/v^3$	221 (169;288) #
Лизиноприл (n=20)	2,27 (2,16;2,37) $*/a^2/v$	0,40 (0,37;0,42) $a/o^2/v^2$	1,32 (1,18;1,40) **	0,58 (0,53;0,62) $n^3$	4,68 (4,31;4,93) $*/o$	196 (149;271)
Эналаприл (n=20)	2,20 (2,10;2,38)	0,41 (0,39;0,44) $a^2/o^3/v^3$	1,29 (1,20;1,36) *	0,55 (0,46;0,62) $n^3$	4,37 (4,22;4,91) $o^3/v^2$	238 (160;294) #
Атенолол (n=20)	1,97 (1,82;2,11)	0,33 (0,31;0,36) $*/###$	1,15 (1,02;1,29)	0,49 (0,43;0,56)	5,00 (4,60;5,50) $***$	232 (173;293) ##
Метопролол (n=20)	2,28 (2,05;2,79) $*/a$	0,42 (0,36;0,58) $a^3/o^3/v^3$	1,40 (1,11;1,60) $***$	0,51 (0,42;0,53) n	4,23 (3,79;4,88) $o^3/v^3$	230 (170;298) ##
Небиволол (n=20)	2,12 (1,94;2,28)	0,37 (0,33;0,38)	1,31 (1,21;1,46) $***$	0,41 (0,36;0,46) $###$	4,90 (4,49;5,20) $***$	248 (171;303) ##
Пиндолол (n=20)	2,03 (1,89;2,11)	0,32 (0,28;0,35) $**/###$	1,18 (1,13;1,24)	0,50 (0,46;0,55)	5,49 (5,18;5,75) $***/##$	183 (150;262)
Пропранолол (n=20)	1,99 (1,86;2,31)	0,30 (0,28;0,23) $**/###$	1,15 (1,04;1,41)	0,56 (0,47;0,61) $n^3$	5,94 (5,56;6,19) $***/###$	263 (169;292) ##

Примечание. \* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ , \*\*\* —  $p < 0,001$  по сравнению с интактными; # —  $p < 0,05$ , ## —  $p < 0,01$ , ### —  $p < 0,001$  по сравнению с группой контроля (XCH); a —  $p < 0,05$ ,  $a^2$  —  $p < 0,01$ ,  $a^3$  —  $p < 0,001$  по сравнению с атенололом; n —  $p < 0,05$ ,  $n^3$  —  $p < 0,001$  по сравнению с небивололом; o —  $p < 0,05$ ,  $o^2$  —  $p < 0,01$ ,  $o^3$  —  $p < 0,001$  по сравнению с пропранололом; v —  $p < 0,05$ ,  $v^2$  —  $p < 0,01$ ,  $v^3$  —  $p < 0,001$  по сравнению с пиндололом

Таблица 2

Липидный спектр плазмы крови (ммоль/л) и коэффициент атерогенности ( $K_a$ ) через 1 сут. после индуцирования обострения хронической сердечной недостаточности (2-я серия) и медиана выживаемости (сут.)

Группа	Общий холестерин	Фракции холестерина			$K_a$	Медиана выживаемости
		ЛПВП	ЛПНП	ЛПОНП		
Интактные (n=10)	1,94 (1,66;2,10)	0,42 (0,38;0,47)	0,98 (0,71;1,12)	0,52 (0,48;0,59)	3,52 (3,13;4,17)	
Контроль (n=11)	1,42 (1,35;1,50) *	0,46 (0,42;0,48)	0,50 (0,43;0,55) **	0,46 (0,42;0,52)	2,15 (1,96;2,34) **	126 (115;133)
Каптоприл (n=12)	1,43 (1,36;1,55) *	0,46 (0,40;0,53)	0,51 (0,47;0,53) $***/c/o/v$	0,49 (0,41;0,54)	2,14 (1,95;2,46) $**/c^2/o^3/v^2$	132 (127;190) $a^2/c^3/o^2$
Лизиноприл (n=14)	1,41 (1,34;1,50) **	0,44 (0,40;0,51)	0,49 (0,43;0,54) $***/c^2/o^2/v^2$	0,47 (0,43;0,51)	2,22 (1,98;2,34) $**/c^3/o^3/v^3$	116 (65;130) $a^4/c^4/m^3/n^3/o^4/v$
Эналаприл (n=12)	1,37 (1,30;1,44) $***/c^2$	0,44 (0,37;0,49)	0,43 (0,42;0,48) $***/c^3/o^3/v^3$	0,51 (0,48;0,54)	2,10 (1,91;2,51) $**/c^2/o^2/v^2$	128 (79;193) a/c/o
Атенолол (n=16)	1,41 (1,32;1,48) $***/c$	0,37 (0,32;0,42)	0,55 (0,52;0,56)	0,48 (0,45;0,52)	2,81 (2,48;3,01)	192 (131;196) $####$
Карведилол (n=19)	1,60 (1,51;1,70)	0,38 (0,34;0,42)	0,63 (0,54;0,68)	0,59 (0,50;0,64)	3,16 (2,90;3,28) ##	193 (188;195) $####$
Метопролол (n=18)	1,38 (1,29;1,48) $***/c^2$	0,39 (0,34;0,43)	0,53 (0,48;0,55) **	0,49 (0,45;0,52)	2,54 (2,37;2,95)	141 (132;193) ##/c
Небиволол (n=15)	1,39 (1,29;1,45) $***/c^2$	0,41 (0,36;0,49)	0,54 (0,49;0,58) *	0,42 (0,39;0,46) $c^3/o^3/v$	2,31 (1,91;2,72) $*/c/o^2/v$	160 (134;193) ##/c
Пиндолол (n=13)	1,49 (1,44;1,60)	0,36 (0,32;0,41)	0,62 (0,58;0,65)	0,54 (0,50;0,57)	3,10 (2,86;3,53) ##	131 (117;195)
Пропранолол (n=18)	1,52 (1,42;1,64)	0,36 (0,31;0,40)	0,60 (0,57;0,64)	0,54 (0,50;0,64)	3,25 (2,99;3,64) $###$	194 (135;228) $####$

Примечание. \* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ , \*\*\* —  $p < 0,001$  по сравнению с интактными; ## —  $p < 0,01$ , ### —  $p < 0,001$ , #### —  $p < 0,0001$  по сравнению с группой контроля (XCH); a —  $p < 0,05$ ,  $a^2$  —  $p < 0,01$ ,  $a^4$  —  $p < 0,0001$  с атенололом; c —  $p < 0,05$ ,  $c^2$  —  $p < 0,01$ ,  $c^3$  —  $p < 0,001$ ,  $c^4$  —  $p < 0,0001$  по сравнению с карведилолом; m —  $p < 0,05$ ,  $m^3$  —  $p < 0,001$  с метопрололом; n —  $p < 0,05$ ,  $n^3$  —  $p < 0,001$  с небивололом; o —  $p < 0,05$ ,  $o^2$  —  $p < 0,01$ ,  $o^3$  —  $p < 0,001$ ,  $o^4$  —  $p < 0,0001$  по сравнению с пропранололом; v —  $p < 0,05$ ,  $v^2$  —  $p < 0,01$ ,  $v^3$  —  $p < 0,001$  по сравнению с пиндололом

В итоге  $K_a$  плазмы при применении неселективных  $\beta$ -адреноблокаторов возрастал в среднем на 44—51% по отношению к контролю, становясь на 40—55% выше, чем при введении ингибиторов АПФ, и на 34—41% — в сравнении с небивололом. При применении атенолола и метопролола имелась лишь тенденция к увеличению  $K_a$  относительно контроля, что нивелировало различия с интактной группой, а на фоне небиволола  $K_a$  существенно не изменялся. Атенолол повысил  $K_a$  на 34% в сравнении с эналаприлом. Медиану выживаемости при ХСН, протекавшей с обострениями, увеличили лишь не обладающие ВСА  $\beta$ -адреноблокаторы на 15—68 сут. по отношению к контролю. Более того, под воздействием атенолола, карведилола и пропранолола крысы жили дольше, чем на фоне ингибиторов АПФ, в среднем на 60—78 сут. Наиболее эффективным среди  $\beta$ -адреноблокаторов был карведилол, увеличивший медиану выживаемости в сравнении с небивололом и метопрололом соответственно на 33 и 52 сут. Медиана выживаемости при применении лизиноприла была наименьшей, чем при лечении любым  $\beta$ -адреноблокатором, в том числе пиндололом, — разница составила от 15 до 78 сут. Таким образом, атерогенные сдвиги в системе липопротеинов плазмы на фоне  $\beta$ -адреноблокаторов не препятствовали положительному влиянию данных препаратов (без ВСА) на выживаемость крыс. Особенно ярко это проявлялось при тяжелом течении ХСН.

### Список литературы

1. *Гуськова Т.А.* Оценка безопасности лекарственных средств на стадии доклинического изучения // Химико-фармацевтический журн. — 1990. — №7. — С. 10-15.
2. *Камышиников В.С.* Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: Справочник: В 2 т. Т. 2. — 2-е изд-е. — Минск, 2003.
3. *Пятницкий Н.Н., Блинков Ю.А.* К вопросу о моделировании недостаточности правого сердца // Кардиология. — 1970. — №1. — С. 143-144.
4. *Румянцева Т.А., Фатеев М.М., Федоров В.Н.* и др. Морфологические доказательства наличия хронической сердечной недостаточности, индуцированной у крыс методом дробного дозированного олеоторакса // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. — 2009. — №5. — С. 123-127.
5. *Charach G., George J., Roth A.* et al. Baseline low-density lipoprotein cholesterol levels and outcome in patients with heart failure // Am. J. Cardiol. — 2010. — Vol. 105, №1. — P. 100-104.
6. *Horwich T.* Low-density lipoprotein in the setting of congestive heart failure: is lower really better? // Curr. Atheroscler. Rep. — 2009. — Vol. 11, №5. — P. 343-349.
7. *Rauchhaus M., Clark A.L., Doehner W.* et al. The relationship between cholesterol and survival in patients with chronic heart failure // J. Am. Coll. Cardiol. — 2003. — Vol. 42. — P. 1933-1943.

Поступила 17.12.12

### Сведения об авторах:

*Сидоров Александр Вячеславович*, канд. мед. наук, доцент каф. фармакологии ГБОУ ВПО ЯГМА Минздрава РФ

Е.В. Бочаров<sup>2</sup>, Р.В. Карпова<sup>1</sup>, И.В. Казеев<sup>1</sup>, В.Г. Кучеряну<sup>2</sup>, О.А. Бочарова<sup>1</sup>

## **Исследование радиозащитной активности мультифитоадаптогена в эксперименте на мышах**

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина Российской академии медицинских наук, Москва, 115478, Каширское ш., 24

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

*В работе изучена радиозащитная активность мультифитоадаптогена (МФА) на мышах при различных условиях  $\gamma$ -облучения и применения препарата. В условиях облучения в дозе 7,5 Гр эффективность МФА выявлена при профилактическом, лечебно-профилактическом и лечебном вариантах применения (выживаемость мышей составила 66,7; 66,4 и 40,2% соответственно). В условиях облучения в дозе 11,0 Гр эффективность профилактического, а также лечебно-профилактического применения МФА составила 75 и 76,9% соответственно. При этом выживаемость мышей контрольных групп составила в среднем 23% при дозе облучения 7,5 Гр и 48% при дозе облучения 11 Гр. Результаты позволяют полагать, что МФА обладает радиозащитным эффектом, вероятно, обусловленным его иммуномодулирующими и антиоксидантными свойствами. МФА увеличивал продолжительность жизни животных, улучшал их общее состояние без побочных эффектов.*

**Ключевые слова:** ионизирующая радиация, мультифитоадаптоген, радиозащитная активность

E.V. Bocharov<sup>2</sup>, R.V. Karpova<sup>1</sup>, I.V. Kazeev<sup>1</sup>, V.G. Kucheryanu<sup>2</sup>, O.A. Bocharova<sup>1</sup>

## **Investigation of multiphytoadaptogene anti-radiation activity in mice**

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

<sup>2</sup> N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, 24, Kashirskoye sh., Moscow, 115478, Russia

*The aim of the work was to elucidate the radioprotective activity of multiphytoadaptogene (MPA) in mice in various conditions of gamma radiation and MPA application. Males of CBA x C57BL/6 F1 mice were given 15% MPA solution with drinking water 2 weeks before the radiating (preventive application), 2 weeks before and 2 weeks after the radiating (preventive and therapeutic application) and also 2 weeks after the radiating only (therapeutic application). Animals of control groups received radiation or were given 5% ethanol solution in drinking water in the same application schemes. MPA increased the mice survival in preventive, preventive and therapeutic as well as therapeutic applications after 7,5 Gy radiation (66,7; 66,4 and 40,2% correspondingly). After 11,0 Gy radiation MPA increased the mice survival in preventive as well as preventive and therapeutic applications (75,0 and 76,9% correspondingly). MPA administration improved the somatic state, weight of animals, quality of life. MPA has no side effects. The data suggest the radioprotective activity of MPA.*

**Key words:** ionizing radiation, multiphytoadaptogen, anti-radiation activity

Возрастающее использование источников ионизирующего излучения в промышленности и медицине определяет актуальность вопросов теоретического и экспериментального обоснования защиты организма от лучевых поражений, а также поиска препаратов, обладающих радиозащитной активностью [7]. Перспективными в этом направлении являются растительные адаптогены. Они повышают неспецифическую сопротивляемость организма к вредным воздействиям различной природы, в том числе к радиации [9], способствуют повышению эффективности лучевой терапии онкологических больных, а также комплексной терапии лучевой болезни [13, 14]. Важным для

проявления радиозащитного эффекта являются антимуtagenные, антиоксидантные, иммуномодулирующие свойства фитоадаптогенов [1, 10, 11, 12, 15].

Мультифитоадаптоген (МФА) представляет собой препарат на основе компонентов экстрактов сорока растений, включенных в Госфармакопею РФ, в том числе известных адаптогенов женьшеня, родиолы, элеутерококка, лимонника, заманихи и аралии. Разработаны способы его биологической и химической стандартизации [2, 8]. В предыдущих исследованиях показаны антиоксидантные, антимуtagenные, противоопухолевые, иммуномодулирующие свойства МФА [5].

*Цель работы* — изучение радиозащитной активности МФА на мышах при различных условиях  $\gamma$ -облучения и применения препарата.

**Для корреспонденции:** Кучеряну Валериан Григорьевич,  
д. мед. наук, гл. научн. сотр. ФГБУ «НИИ ОПП» РАМН.  
E-mail: VKucheryanu@mail.ru

Радиозащитное действие мультифитоадаптогена в опытах на мышах в условиях пролонгированного  $\gamma$ -облучения в дозе 7,5 Гр

№ группы (условия эксперимента)	Кол-во мышей в группе	Кол-во выживших мышей	Выживаемость мышей*, %	СПЖ погибших мышей (сут.)
1. (МФА + O)	15	10	66,7	16,4±0,9
2. (МФА + O + МФА)	15	10	66,4	16,2±1,2
3. (O + МФА)	15	6	40,2	13,9±1,4
4. (S + O)	15	4	26,8	12,5±1,0
5. (S + O + S)	15	4	26,8	12,4±1,1
6. (O + S)	15	2	13,4	12,0±0,8
7. (Контроль)	31	8	25,7	11,7±0,7
p			p <sub>1-4</sub> < 0,05 p <sub>2-5</sub> < 0,05 p <sub>3-6</sub> < 0,01	p <sub>1-4</sub> = 0,02 p <sub>2-5</sub> = 0,05 p <sub>3-6</sub> > 0,05

Примечание. МФА — применение препарата; S — применение 5% раствора этанола; O — облучение; \* — наблюдение в течение 30 дней; достоверность различий оценивали с использованием критерия  $\chi^2$

### Методика

Исследование проводили на 252 мышах-самцах гибридах  $F_1$  (CBA x C57BL/6) весом  $21,0 \pm 0,8$  г. Животных подвергали общему пролонгированному  $\gamma$ -облучению в дозе 7,5 Гр на цезиевой установке ИГУР ( $^{137}\text{Cs}$ ) с мощностью дозы 2,0 сГр/мин и в дозе 11,0 Гр на установке ГУБ-1 ( $^{137}\text{Cs}$ ) с мощностью дозы 1,0 сГр/мин. По предварительным испытаниям выбранные дозы  $\gamma$ -облучения близки к  $LD_{50/30}$ . Время облучения мышей для дозы 7,5 Гр составило 6,3 ч, для 11 Гр — 18,3 ч. Животных всех групп содержали в одинаковых условиях.

Животные были разделены на 7 групп. Опытные группы: 1 — мыши, подвергшиеся  $\gamma$ -облучению и получавшие МФА в профилактическом режиме в течение 2 недель до облучения; 2 — мыши, подвергшиеся  $\gamma$ -облучению и получавшие МФА в лечебно-профилактическом режиме в течение 2 недель до и 2 недель после облучения; 3 — мыши, подвергшиеся  $\gamma$ -облучению и получавшие МФА в лечебном режиме в течение 2 недель после облучения. Контрольные группы 4, 5, 6 — мыши, подвергшиеся  $\gamma$ -облучению и получавшие в качестве питья 5% раствор этанола в тех же режимах; 7 — мыши, подвергшиеся  $\gamma$ -облучению, получавшие в качестве питья воду.

Мыши опытных групп получали МФА в виде 15% раствора, исходя из эффективной дозы, определенной в предыдущих исследованиях [2, 3].

Основными критериями радиозащитного действия МФА являлись выживаемость облученных мышей, а также средняя продолжительность жизни погибших мышей (СПЖ). Дополнительно оценивали общее состояние животных, а также динамику веса.

Статистический анализ результатов проводили с использованием программы «Statistica 6.0». Анализ выживаемости проводили по методу Каплана—Мейера с определением статистической достоверности различия между группами с использованием критерия F-Кокса и  $\chi^2$ .

### Результаты и обсуждение

Результаты работы показали, что в условиях облучения пролонгированного  $\gamma$ -облучения мышей в дозе 7,5 Гр применение 5% раствора этанола в разных режимах не оказывало радиозащитного действия. Применение МФА в опытных группах 1 и 2 увеличило выживаемость мышей на 40%, в группе 3 — на 27%. СПЖ погибших мышей 1 и 2 опытных групп достоверно увеличилась в 1,3 раза (табл. 1).

Анализ кривых выживаемости мышей (рис. 1) с использованием критерия F-Кокса выявил статисти-

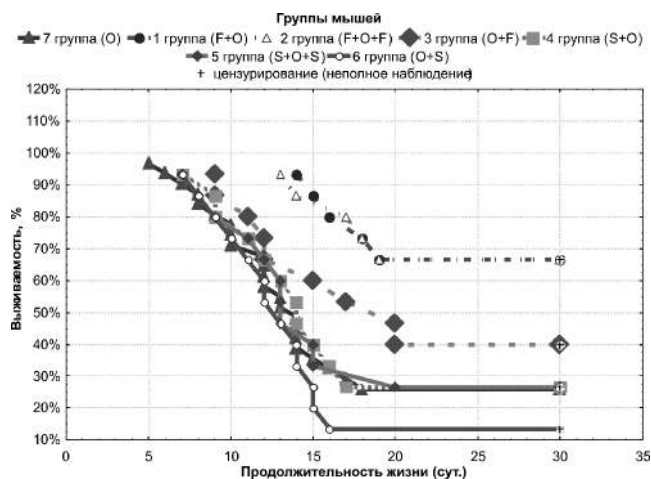


Рис. 1. Кривые выживаемости мышей при разных вариантах применения мультифитоадаптогена в условиях пролонгированного  $\gamma$ -облучения в дозе 7,5 Гр (метод Каплана—Мейера):  $p_{1-4} < 0,01$ ;  $p_{2-5} < 0,01$ ;  $p_{3-6} < 0,05$  (по критерию F-Кокса)



чески значимые различия между опытными и соответствующими контрольными группами ( $p_{1.4} < 0,01$ ;  $p_{2.5} < 0,01$ ;  $p_{3.6} < 0,05$ ).

Из табл. 2 следует, что в условиях общего пролонгированного  $\gamma$ -облучения в дозе 11,0 Гр выживаемость мышей в опытных группах имела тенденцию повышения по сравнению с соответствующими «спиртовыми» контролями. Вместе с тем с использованием критерия F-Кокса было выявлено, что расхождение кривых выживаемости (рис. 2) статистически значимо между объединенными данными опытных групп 1 (МФА+О), 2 (МФА+О+МФА) и объединенными данными соответствующих контрольных групп 4 (S+O) и 5 (S+O+S). СПЖ погибших мышей из всех опытных групп имела тенденцию увеличения.

У мышей, принимавших МФА в профилактическом режиме до облучения в дозе 7,5 Гр, вес тела снизился незначительно и только в первую неделю после облучения, но быстро восстановился, а к концу наблюдения превысил исходный вес на 10%. При использовании МФА в лечебно-профилактическом режиме вес животных не снизился, а к концу эксперимента увеличился на 20% по отношению к исходному. В остальных группах наблюдали незначительное снижение веса у мышей, который до конца эксперимента не восстановился.

В условиях облучения в дозе 11 Гр снижение веса животных, не восстановившееся к концу наблюдения, было отмечено в контрольных группах мышей. Во всех опытных группах вес животных через 30 сут. после облучения превышал исходный уровень на 10%.

Таким образом, полученные результаты исследования свидетельствуют, что мультифитоадаптоген обладает противолучевыми свойствами при пролонгированном  $\gamma$ -облучении при дозе, близкой к  $LD_{50/30}$ . Максимальная эффективность наблюдалась при ис-

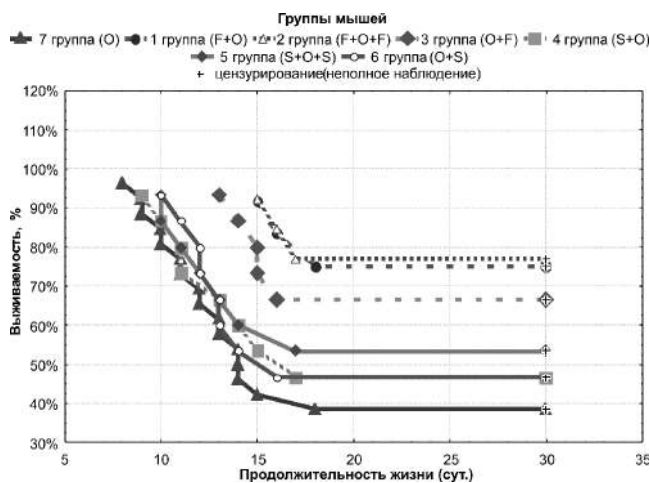


Рис. 2. Кривые выживаемости мышей при разных вариантах применения мультифитоадаптогена в условиях пролонгированного  $\gamma$ -облучения в дозе 11,0 Гр (метод Каплана—Мейера): различие по кривым выживаемости достоверны между группами 1(МФА + О) + 2(МФА + О + МФА) и 4(S + О) + 5(S + О + S) ( $p < 0,05$ ) (по критерию F-Кокса)

пользовании препарата в профилактическом и лечебно-профилактическом режимах. Мультифитоадаптоген увеличивал выживаемость и продолжительность жизни облученных животных, улучшал общее состояние мышей, не обладал побочными действиями.

Радиозащитное действие мультифитоадаптогена, вероятно, обусловлено его иммуномодулирующими и антиоксидантными свойствами. Вместе с тем можно отметить, что полученные эффекты радиозащитного действия являются клиническим проявлением и косвенным доказательством антимуtagenности МФА [5]. В связи с этим препарат может не только способствовать повышению эффективности лучевой терапии, но обладать профилактическими свойствами в отношении заболеваний, вызываемых мутациями.

Таблица 2

Радиозащитная эффективность мультифитоадаптогена в опытах на мышах в условиях пролонгированного  $\gamma$ -облучения в дозе 11,0 Гр

№ группы (условия эксперимента)	Кол-во мышей в группе	Кол-во выживших мышей	Выживаемость мышей*, %	СПЖ погибших мышей (сут.)
1. (МФА + О)	12	9	75,0	16,3±0,9
2. (МФА + О + МФА)	13	10	76,9	16,0±0,6
3. (О + МФА)	15	10	66,7	14,6±0,5
4. (S + О)	15	7	46,7	12,5±1,0
5. (S + О + S)	15	8	53,3	12,4±0,9
6. (O + S)	15	8	53,3	12,6±0,7
7. (Контроль)	26	10	38,5	12,1±0,7
p				$p_{1-4} = 0,05$ $p_{2-5} = 0,05$

Примечание. МФА — применение препарата; S — применение 5% раствор этанола; O — облучение; \* — наблюдение в течение 30 дней; достоверность различий оценивали с использованием критерия  $\chi^2$

Авторы выражают благодарность сотрудникам ГНЦ-ИБФ канд. мед. наук Знаменскому В.В., канд. мед. наук Щеголевой Р.А., канд. биол. наук Лисиной Н.И. за помощь в работе и предоставленные материалы.

### Список литературы

1. Бочаров Е.В., Крыжановский Г.Н., Полещук В.В., Кучеряну В.Г., Горожанская Э.Г., Сандалов Ю.Г., Бочарова О.А. Нарушение иммунной и антиоксидантной защиты при болезни Паркинсона // Патогенез — 2012. — №2. — С. 11-14.
2. Бочарова О.А., Лысенкова М.А., Куренная О.Н. и др. Способ биологического контроля комплексного фитоадаптогена // Бюлл. экспер. биол. и мед. 2003. — Т. 136, №12. — С. 694-696.
3. Бочарова О.А., Матвеев В.Б., Карпова Р.В. и др. Коррекция клинических и иммунобиологических показателей у мужчин с доброкачественной гиперплазией предстательной железы фитоадаптогеном // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 2006. — Т. 141, №5. — С. 555-559.
4. Бочарова О.А., Барышников А.Ю., Давыдов М.И. Фитоадаптогены в онкологии и геронтологии (на примере изучения Фитомикса-40). — М.: МИА. — 2008. — 218 с.
5. Бочарова О.А., Давыдов М.И., Клименков А.А. и др. Перспективы применения фитоадаптогена в лечении распространенного рака желудка // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 2009. — Т. 148, №7. — С. 96-99.
6. Бочков Н.П., Бочарова О.А., Аксенов А.А. и др. Частота хромосомных aberrаций в лимфоцитах пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы // Медицинская генетика. — 2005. — Т. 4, №1. — С. 15-19.
7. Васин М.В. Классификация средств профилактики лучевых поражений как формирование концептуального базиса современной радиационной фармакологии // Радиационная биология. Радиоэкол. — 1999. — Т. 29, №2-3. — С. 212-222.
8. Шейченко О.П., Бочарова О.А., Крапивкин Б.А. и др. Исследование комплексного фитоадаптогена методом ВЭЖХ // Вопр. биол. мед. фарм. химии. — 2012. — №10. — С. 52-59.
9. Arora R., Gupta D., Chawla R. et al. Radioprotection by plant products: present status and future prospects // Phytother. Res. — 2005. — Vol. 19, №1. — P. 1-22.
10. Chae S., Kang K., Youn U. et al. Comparative Study of the Potential Antioxidant Activities of Ginsenosides // J. Food Biochem. — 2010. — Vol. 34. — P. 31-43.
11. Goel H., Bala M., Prasad J. et al. Radioprotection by *Rhodiola imbricata* in mice against whole-body lethal irradiation // J. Med. Food. — 2006. — Vol. 9, №2. — P. 154-160.
12. Lee T., O'Brien K., Wang W. et al. Radioprotective effect of American ginseng on human lymphocytes at 90 minutes postirradiation: A study of 40 cases // J Altern. Complement. Med. — 2010. — Vol. 16. — P. 561-567.
13. Qi F., Li A., Inagak Y. et al. Chinese herbal medicines as adjuvant treatment during chemo- or radio-therapy for cancer // Biosci Trends. — 2010. — Vol. 4, №6. — P. 297-307.
14. Verma P., Sharma P., Parmar J. et al. Amelioration of radiation-induced hematological and biochemical alterations in Swiss albino mice by *Panax ginseng* extract // Integr. Cancer Ther. — 2011. — Vol. 10, №1. — P. 77-84.
15. Yuan C., Wang C., Wicks S., Qi L. Chemical and pharmacological studies of saponins with a focus on American ginseng // J. Ginseng Res. — 2010. — Vol. 34, №3. — P. 160-167.

Поступила 04.06.13

### Сведения об авторах:

Бочаров Евгений Валерианович, канд. мед. наук, старш. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы ФГБУ НИИОПП РАМН

Карпова Регина Васильевна, канд. биол. наук, старш. науч. сотр. лаб. иммунофармакологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН

Казеев Илья Владимирович, канд. техн. наук, старш. науч. сотр. лаб. иммунофармакологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН

Кучеряну Валериан Григорьевич, д-р мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы ФГБУ НИИОПП РАМН

Бочарова Ольга Алексеевна, д-р биол. наук, зав. лаб. иммунофармакологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН

В.П. Куликов, П.П. Трегуб, А.Г. Беспалов, А.Ю. Введенский

## **Сравнительная эффективность гипоксии, гиперкапнии и гиперкапнической гипоксии в увеличении резистентности организма к острой гипоксии в эксперименте**

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

*Изучали сравнительную эффективность тренировок с изолированной гипоксией, гиперкапнией и гипоксией в сочетании с гиперкапнией на увеличение резистентности организма к действию экстремальной кислородной недостаточности. Показано, что сочетанное воздействие гипоксией и гиперкапнией (гиперкапническая гипоксия) оказывает более выраженный эффект по сравнению с изолированной гипоксией и гиперкапнией, что подтверждается значительным увеличением времени потери позы и времени жизни при экстремальной гипоксии. Также показано, что гиперкапния в сочетании с гипоксией оказывает доминирующее влияние на формирование неспецифической резистентности, так как изолированная гиперкапния более эффективно увеличивает показатели неспецифической резистентности, чем изолированная гипоксия.*

**Ключевые слова:** гипоксия, гиперкапния, гиперкапническая гипоксия, гипобарическая гипоксия, неспецифическая резистентность

V.P. Kulikov, P.P. Tregub, A.G. Bepalov, A.J. Vvedenskiy

## **Comparative efficacy of hypoxia, hypercapnia and hypercapnic hypoxia increases body resistance to acute hypoxia in rats**

Altay state medical university, Barnaul, Lenin str., 40

*The relative efficiency of trainings with isolated hypoxia, hypercapnia and hypoxia in aggregate with hypercapnia in order to enhance the resistance of organism to the effect of an extreme hypoxia was studied. The combined effect of the hypoxia and hypercapnia was shown to influence more greatly in comparison with the effect of an isolated hypoxia. This effect was supported with an increase in the time of the loss position and the time of the animal's life under the condition of an extreme hypoxia. Also it is shown that the hypercapnia in a combination to a hypoxia makes dominating impact on formation of nonspecific resistance as the isolated hypercapnia enlarges indicators of nonspecific resistance, than the isolated hypoxia more effectively.*

**Key words:** Hypoxia, hypercapnia, hypercapnic hypoxia, hypobaric hypoxia, nonspecific resistance

Известно, что гипоксия повышает неспецифическую резистентность организма [1, 2, 8, 13]. Около 30 лет назад было показано, что устойчивость к экстремальному дефициту кислорода после 30-суточного курса тренировок, повышается более выражено при сочетании гипоксии с гиперкапнией, чем при аналогичных тренировках «чистой» гипоксией [4]. Также было показано, что сочетанное воздействие гипоксии с гиперкапнией увеличивает диаметр и площадь поперечного сечения коронарных сосудов и повышает толерантность миокарда к ишемии, значительно эффективнее, чем изолированная гипоксия [5]. Устойчи-

вость организма к экстремальной гипоксии предопределяется, прежде всего, резистентностью к этому воздействию головного мозга, т.е. нейрорезистентностью [3]. Однако дальнейшего углубленного исследования эффективности сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии не проводилось.

В настоящее время растет интерес к гиперкапнии, как средству повышения толерантности мозга к гипоксии. В литературе появился термин — «терапевтическая гиперкапния», которым обозначается защищающий мозг эффект гиперкапнии, создаваемый после экспериментальной ишемии/гипоксии [14, 17].

*Цель работы* — оценка эффективности гипоксических, гиперкапнических и гиперкапнически-гипоксических респираторных тренировок в увеличении неспецифической резистентности организма.

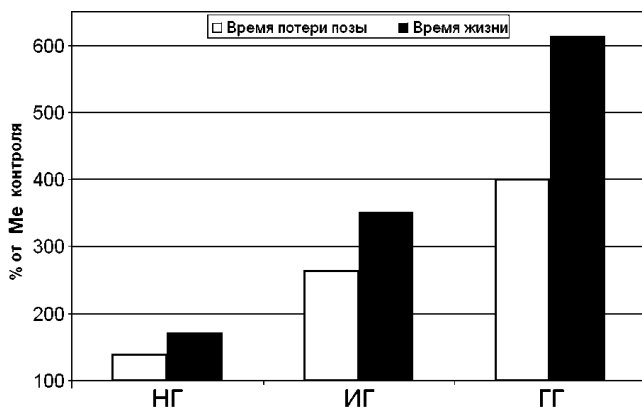
**Для корреспонденции:** Куликов Владимир Павлович, д-р мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии, ультразвуковой и функциональной диагностики ГБОУ ВПО «АГМУ» Минздрава России. E-mail: kulikov57@mail.ru

### Методика

Работа выполнена на 60 белых половозрелых крысах-самцах Wistar, массой  $284,5 \pm 46$  г в возрасте 9—10 мес. Все животные были разделены на 4 равные группы, прошедшие впоследствии 15-дневный курс тренировок: гипоксических, гиперкапнических или гиперкапнически-гипоксических, четвертая группа была контрольной.

Неспецифическую резистентность оценивали с помощью острой гипобарической гипоксии, которую создавали путем подъема крыс в барокамере на критическую высоту (11500 м) со скоростью 183 м/с [6]. Регистрировали время потери позы (ВПП), оцениваемое по принятию животным бокового положения, и время жизни (ВЖ), определяемое по появлению второго агонального вдоха.

За 2 нед. до начала тренировок, была проведена оценка исходного уровня резистентности и рандомизация животных. Для моделирования газовых состояний использовали специальную проточную камеру (жизненный объем на одно животное составлял 4,0 л), в которую при помощи компрессора подавалась заданная смесь газов со скоростью 15 л/мин. Камера имела выпускное отверстие, соединенное при помощи шланга с емкостью, наполненной водой, что обеспечивало стравливание из камеры повышенного давления газов. Для создания в организме животных нормобарической гипоксии применялась газовая смесь с концентрацией  $O_2$  13%, для изолированной гиперкапнии — с концентрацией  $CO_2$  7%, а для моделирования гиперкапнической гипоксии —  $O_2$  13% и  $CO_2$  7%. Контрольная группа также помещалась в камеру при аналогичных условиях, но, вместо газовой смеси, компрессором нагнетался атмосферный воздух. Контроль газового состава камеры производился газоанализатором «Микон» (Россия).



Показатели неспецифической резистентности к гипоксии у крыс, прошедших 15-суточный курс тренировок:

НГ — нормобарическая гипоксия; ИГ — изолированная гиперкапния; ГГ — гиперкапническая гипоксия. Все значения достоверно отличались как от контроля, так и между опытными группами при  $p < 0,05$

Тренировки животных в проточной камере проводились в течение 15 сут. по 20 мин ежедневно. На следующие сутки после окончания тренировок у всех животных повторно проводили оценку резистентности к острой гипобарической гипоксии.

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программного пакета Statistics for Windows v.11.0. Значимость различий измеряемых параметров оценивали с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни для независимых выборок. Все показатели были представлены в виде средних величин (медиана — Me), нижнего и верхнего квартиля (25%; 75%) из 15 измерений. Значения  $p < 0,05$  рассматривались как достоверные.

### Результаты и обсуждение

В контрольной группе уровень резистентности животных к экстремальной гипоксии в течение эксперимента не изменялся. При этом во всех опытных группах существенно возросли показатели ВПП и ВЖ. Способность дольше сохранять нормальную позу и двигательную активность в условиях критической нехватки кислорода свидетельствует об увеличении устойчивости головного мозга и организма в целом к экстремальному дефициту кислорода, а увеличение времени жизни — об увеличении способности животного к максимальной мобилизации жизненно важных функций организма в сублетальный период [6]. Из этого следует, что гипоксия, гиперкапния, и их сочетанное воздействие значимо увеличивают резистентность крыс к острой гипобарической гипоксии (рисунк).

Среди опытных групп самый низкий прирост ВПП и ВЖ по отношению к контролю наблюдался в группе животных, тренированных нормобарической гипоксией. ВПП в этой группе возросло примерно на 50%, а ВЖ в 1,5 раза. Сходные результаты по эффективности нормобарической гипоксии были получены ранее Л.Д. Лукьяновой с соавторами [7]. В группе изолированной гиперкапнии ВПП у крыс увеличилось более чем в 1,5 раза, а ВЖ превышало аналогичный показатель контроля в 2,5 раза. Эти данные свидетельствуют о превосходящей гипоксию нейропротекторной эффективности гиперкапнии. Тренировки с гиперкапнической гипоксией показали наибольшее среди опытных групп увеличение показателей неспецифической резистентности. ВПП в этой группе было больше контрольного в 4 раза, а ВЖ более чем в 6 раз. Из этого следует, что гиперкапнически-гипоксические тренировки наиболее эффективны для увеличения резистентности организма к экстремальной гипоксии.

Поскольку эффективность изолированной гиперкапнии для повышения резистентности к экстремаль-

ной гипоксии была намного выше, чем использование нормобарической гипоксии, можно сделать вывод о доминирующем влиянии гиперкапнии для повышения резистентности организма при ее сочетанном воздействии с гипоксией. Потенцирование гиперкапнией нейропротекторной эффективности гипоксии при их сочетанном воздействии может быть связано с известными эффектами углекислоты: модулирование сосудистой реактивности и увеличение перфузии в мозге [11] и легких [9], активация антиоксидантной системы [15, 16], модуляция калиевых каналов [10, 12] и ингибирование каспазы-3, индуцирующей апоптоз [17].

Таким образом, тренировки с гиперкапнической гипоксией обладают наибольшей эффективностью для повышения толерантности к экстремальной гипоксии по сравнению с изолированной гипоксией и гиперкапнией. При этом гиперкапния является доминирующим фактором в формировании резистентности при сочетанном воздействии с гипоксией.

### Список литературы

1. *Агаджанян Н.А., Миррахимов М.М.* Горы и резистентность организма. — М.: Наука, 1970.
2. *Агаджанян Н.А., Стрелков Р.Б., Чижов А.А.* Прерывистая нормобарическая гипокситерапия (исторические предпосылки, теоретическое обоснование и результаты применения). Прерывистая нормобарическая гипокситерапия. Т. 1. — М., 1997.
3. *Гусев В.И., Скворцова В.И.* Ишемия головного мозга. — М.: Медицина, 2001.
4. *Зверькова Е.Е.* Изменение общей резистентности крыс под влиянием повторяющихся гипоксически-гиперкапнических воздействий // Физиологический журнал СССР. — 1980. — №10. — С. 1575-1578.
5. *Зверькова Е.Е.* Повышение резистентности миокарда к питуитриновому повреждению путем адаптации к гипоксии // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 1982. — №5. — С. 42-44.
6. *Лукьянова Л.Д.* Методические рекомендации к экспериментальному изучению препаратов, предназначенных для клинического изучения в качестве антигипоксических средств. — М., 1990.
7. *Лукьянова Л.Д., Германова Э.Л., Цыбина Т.А.* и др. Эффективность и механизм действия различных типов гипоксических тренировок. Возможность их оптимизации // Патогенез. — 2008. — №3. — С. 32-36.
8. *Лукьянова Л.Д., Германова Э.Л., Копаладзе Р.А.* Закономерности формирования резистентности организма при разных режимах гипоксического preconditionирования: роль гипоксического периода и реоксигенации // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2009. — Т. 147, №4. — С. 380-384.
9. *Chuang I.C., Dong H.P., Yang R.C.* et al. Effect of carbon dioxide on pulmonary vascular tone at various pulmonary arterial pressure levels induced by endothelin-1 // Lung. — 2010. — №188 (3). — P. 199-207.
10. *Huckstepp R.T., Dale N.* CO<sub>2</sub>-dependent opening of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel // Pflugers Arch. — 2011. — №461 (3). — P. 337-344.
11. *Kulikov V.P., Beshpalov A.G., Yakushev N.N.* The State of Cerebral Hemodynamics in Conditions of Prolonged Adaptation to Hypercapnic Hypoxia // Neuroscience and Behavioral Physiology. — 2009. — №39 (3). — P. 269-273.
12. *Lindauer U., Vogt J., Schuh-Hofer S.* et al. Cerebrovascular vasodilation to extraluminal acidosis occurs via combined activation of ATP-sensitive and Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 2003. — №23 (10). — P. 1227-1238.
13. *Shatilo V.B., Korkushko O.V., Ischuk V.A.* et al. Effects of intermittent hypoxia training on exercise performance, hemodynamics, and ventilation in healthy senior men // High Alt. Med. Biol. — 2008. — №9 (1). — P. 43-52.
14. *Vannucci R.C., Towfighi J., Heitjan D.F., Brucklacher R.M.* Carbon dioxide protects the perinatal brain from hypoxic-ischemic damage: an experimental study in the immature rat // Pediatrics. — 1995. — №95 (6). — P. 868-874.
15. *Vesela A., Wilhelm J.* The role of carbon dioxide in free radical reactions of the organism // Physiol. Res. — 2002. — №51 (4). — P. 335-339.
16. *Zakynthinos S., Katsaounou P., Karatza M.H.* et al. Antioxidants increase the ventilatory response to hyperoxic hypercapnia // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2007. — №175 (1). — P. 62-68.
17. *Zhou Q., Cao B., Niu L.* et al. Effects of permissive hypercapnia on transient global cerebral ischemia-reperfusion injury in rats // Anesthesiology. — 2010. — №112. — P. 288-297.

Поступила 12.04.12

### Сведения об авторах:

*Беспалов Андрей Григорьевич*, канд. мед. наук, доцент каф. патофизиологии, ультразвуковой и функциональной диагностики ГБОУ ВПО «АГМУ» Минздрава России

*Трегуб Павел Павлович*, студент 6 курса лечебного факультета ГБОУ ВПО «АГМУ» Минздрава России

*Введенский Александр Юрьевич*, студент 6 курса лечебного факультета ГБОУ ВПО «АГМУ» Минздрава России

В.И. Корозин, Ю.Д. Ляшев, А.В. Солин

## **Влияние фактора роста гепатоцитов на процессы перекисного окисления липидов при стрессе**

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, 305004, Курск, ул. Карла Маркса, 3

*Исследовано влияние фактора роста гепатоцитов (ГФР) на активацию перекисного окисления липидов и активность ферментов антиоксидантной системы в плазме крови крыс при иммобилизационном стрессе. Установлено, что изучаемый пептид снижал стресс-индуцированную активацию перекисного окисления липидов (ПОЛ), что проявлялось уменьшением содержания промежуточных и конечных метаболитов ПОЛ в плазме крови. ГФР также вызывал повышение активности фермента антиоксидантной системы каталазы, которая уменьшалась под влиянием стресса.*

**Ключевые слова:** стресс, фактор роста гепатоцитов, перекисное окисление липидов, ферменты антиоксидантной системы

V.I. Korosin, Yu.D. Lyashev, A.V. Solin

## **The influence of hepatocyte growth factor on lipid peroxidation processes in stress**

Kursk State Medical University, 3, Karla Marksa str., 305004, Kursk, Russia

*The influence of hepatocyte growth factor (HGF) on the activation of lipid peroxidation (LP) and activity of antioxidant enzymes in rat plasma was investigated in immobilization stress. It was established that investigated peptide decreases stress-induced activation of lipid peroxidation manifesting by the decrease of the content of intermediate and final metabolites of LP in plasma. HGF causes the increase of the activity of catalase (enzyme of antioxidant system) also, which decreased under stress influence.*

**Key words:** stress, hepatocyte growth factor, lipid peroxidation, antioxidants enzymes

В настоящее время стресс рассматривается как разветвленная системная реакция организма [8]. Развитие острого стресса характеризуется нарушением микроциркуляции в различных органах-мишенях [8], развитием прооксидантно-антиоксидантного дисбаланса [3], повреждением клеток и тканей. Вышесказанное обуславливает необходимость поиска новых препаратов, обеспечивающих не только предупреждение активации разрушительных механизмов, но и восстановление поврежденных тканевых структур. В связи с этим интерес представляют регуляторные пептиды, обладающие уникальной совокупностью физиологических эффектов.

*Цель исследования* — изучение влияния фактора роста гепатоцитов (ГФР) на активацию процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) при иммобилизационном стрессе.

**Для корреспонденции:** Солин Алексей Владимирович, канд. мед. наук, старш. преп. каф. анатомии ГБОУ ВПО КГМУ Минздрава России. E-mail: medps@yandex.ru

### **Методика**

Работа выполнена на 80 крысах-самцах Вистар. Животные были разделены на 10 групп по 8 крыс в каждой. Крысы одной группы оставались интактными. Опытных животных подвергали действию 6-часового иммобилизационного стресса путем фиксации животного на спине на специальном столике. Животных выводили из эксперимента через 39 ч, 4 и 7 сут. после окончания иммобилизации. Выбор указанных сроков обусловлен данными литературы о том, что максимальные повреждения внутренних органов развиваются в конце стадии тревоги (39 ч после стресса), а в начале стадии резистентности (на 4 сут.) и через 7 суток после окончания иммобилизации наглядно проявляются компенсаторные процессы в поврежденных органах [1].

Содержание в плазме крови продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ): ацилгидроперекисей (АГП) и малонового диальдегида (МДА), а также активность ферментов антиоксидантной системы: супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы, оценивали

традиционными методами [4, 5, 7]. Уровень АГП определяли добавлением к исследуемой пробе 20% раствора тиоцианата аммония. Об относительном содержании АГП судили по величине оптической плотности при 480 нм. Для определения МДА к исследуемой пробе добавляли тиобарбитуровую кислоту, а затем измеряли оптическую плотность при 532 нм и рассчитывали количество МДА в мкмоль/л.

В работе использован пептид глицил-гистидин-лизин, получивший название фактор роста гепатоцитов, в дозах 2 или 10 мкг на кг. Пептид вводили внутривенно ежедневно 1 раз в сутки в течение 5 дней после проведения иммобилизации в объеме 0,2 мл. Контрольным животным аналогично вводили физраствор.

Результаты исследования обработаны статистически с использованием критериев Стьюдента и Фишера.

### Результаты и обсуждение

Моделирование иммобилизационного стресса сопровождается активацией процессов ПОЛ, что проявляется статистически значимым повышением содержания в плазме крови АГП и МДА на всех сроках наблюдения. Кроме того, отмечается снижение активности каталазы. Активность СОД повышается через 39 ч после иммобилизации, а в последующем она снижается и на 7 сут. не отличается значимо от аналогичного показателя в исходной группе.

Введение ГФР в дозах 2 мкг/кг или 10 мкг/кг вызывало уменьшение содержания АГП по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ — $0,001$ ), а кон-

центрация МДА существенно не отличалась от контроля через 39 ч после моделирования стресса. Установлено увеличение активности СОД, но не каталазы у крыс, получавших исследуемый пептид. На 4-е сут. эксперимента установлены существенно более низкие значения содержания как АГП, так и МДА по сравнению с контрольной группой. В этот период отмечается более высокая активность ферментов антиоксидантной системы: СОД и каталазы. Следует отметить, что на 4-е сут. активность каталазы у животных, которым вводили ГФР, повышается, тогда как у контрольных крыс продолжается ее снижение. Через 7 сут. после моделирования стресса наблюдается значимо более низкое содержание в плазме крови как АГП, так и МДА по сравнению с контрольными. Активность СОД и каталазы при введении пептида в дозах как 2, так и 10 мкг/кг, также существенно выше, чем у контрольных крыс.

Таким образом, установлено, что применение ГФР в течение 5 сут. после 6-часовой иммобилизации снижает степень стресс-индуцированной активации процессов ПОЛ. Такой эффект проявлялся на 4-е и 7-е сут. эксперимента при использовании пептида в обеих исследованных дозах. В эти же сроки под влиянием ГФР наблюдается повышение активности ферментов антиоксидантной системы. Действие пептида было более выражено при его использовании в дозе 10 мкг/кг, что проявлялось нормализацией содержания МДА и значительным повышением активности каталазы уже на 4-е сут. эксперимента.

Развитие стрессорной реакции сопровождается нарушениями микроциркуляции и гипоксией тканей и

Таблица

Влияние фактора роста гепатоцитов на содержание малонового диальдегида, ацилгидроперекисей и активность ферментов антиоксидантной системы в плазме крови при иммобилизационном стрессе

Исследуемая группа	Показатель				
	Срок после иммобилизации	Содержание малонового диальдегида, мкмоль/л ( $M \pm m$ )	Содержание ацилгидроперекисей, условные единицы ( $M \pm m$ )	Активность супероксиддисмутазы, условные единицы/мл ( $M \pm m$ )	Активность каталазы, мкат/л ( $M \pm m$ )
Исходная группа		2,09±0,03***	0,15±0,02***	1,39±0,04*	14,29±0,23***
Контрольная группа	39 часов	6,12±0,14	0,85±0,03	1,55±0,05	11,01±0,55
	4 суток	4,73±0,22	0,37±0,03	1,47±0,05	10,86±0,25
	7 суток	3,41±0,22	0,37±0,03	1,36±0,03	11,59±0,29
Группа, получавшая фактор роста гепатоцитов в дозе 2 мкг/кг	39 часов	6,03±0,09	0,62±0,06*	1,73±0,03*	10,7±0,30
	4 суток	3,46±0,18***	0,23±0,02**	1,76±0,05***	13,51±0,26***
	7 суток	2,61±0,15*	0,25±0,02**	1,52±0,08***	14,16±0,55***
Группа, получавшая фактор роста гепатоцитов в дозе 10 мкг/кг	39 часов	6,33±0,25	0,53±0,04***	1,80±0,02**	11,25±0,65
	4 суток	1,91±0,06***	0,26±0,02*	1,63±0,03*	16,40±0,33***
	7 суток	2,32±0,07**	0,26±0,02*	1,48±0,03*	16,75±0,27***

Примечание. \* —  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой; \*\* —  $p < 0,01$  по сравнению с контрольной группой; \*\*\* —  $p < 0,001$  по сравнению с контрольной группой

органов [6]. Это способствует активации ПОЛ, что приводит к повреждению клеточных структур. Ранее показано, что ГФР и его производные обладают протективным действием при поражениях различных органов, вызванных ишемией-реперфузией [11, 12]. Кроме того, этот пептид предотвращает послеоперационное повреждение печени, сопровождающееся расстройствами микроциркуляции [2]. В литературе имеются сведения об эффективности ГФР при ферритин-зависимой активации ПОЛ [10]. Как установлено, в нашем исследовании защитное действие ГФР при его длительном введении, связанное с предупреждением избыточной активации ПОЛ, наблюдается и при стрессе. Это открывает новые возможности применения регуляторных пептидов для предупреждения стресс-индуцированных повреждений, поскольку ГФР не только, уменьшает тканевую деструкцию, но и усиливает регенерацию тканей [9].

### Список литературы

1. *Выборова И.С., Ханджиев Удвал, Васильева Л.С., Макарова Н.Г.* Структура печени в динамике иммобилизационного стресса // Сибирский медицинский журнал. — 2005. — №3. — С. 30-33.
2. *Гальперин Э.И., Абакумова О.Ю., Платонова Л.В.* и др. Термостабильный фактор роста гепатоцитов и энергетический обмен после частичной гепатэктомии у крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1999. — Т. 127, №1. — С. 53-56.
3. *Заводская И.С., Сапронов Н.С., Бульон В.В., Хныченко Л.К.* Экспериментальное обоснование фармакотерапии сердечно-сосудистой и гастроудоденальной патологии, вызванной экстремальными воздействиями на организм // Вестник Российской академии медицинских наук. — 1998. — №1. — С. 23-26.
4. *Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е.* Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. — 1988. — №1. — С. 16-19.
5. *Макаренко Е.В.* Комплексное определение активности супероксиддисмутазы и глутатионредуктазы в эритроцитах больных с хроническими заболеваниями печени // Лабораторное дело. — 1988. — №11. — С. 48-50.
6. *Симоненков А.П., Федоров В.Д.* Современная концепция стресса и адаптации с учетом новых данных о генезе тканевой гипоксии // Вестник Российской академии медицинских наук. — 2008. — №5. — С. 7-14.
7. *Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича.* — М.: Медицина, 1977. — 391 с.
8. *Судаков К.В.* Новые акценты классической концепции стресса // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1997. — Т. 123, №2. — С. 124-130.
9. *Kato K.* Effect of hepatocyte growth factor on the proliferation of intrasplenically transplanted hepatocytes in rats / K. Kato, K. Onodera, M. Sawa // Biochemistry Biophysics Research Communications. — 1996. — Vol. 222, №1. — P. 101-106.
10. *Miller D.M., DeSilva D., Pickart L., Aust S.D.* Effects of glycyl-histidyl-lysyl chelated Cu(II) on ferritin dependent lipid peroxidation // Advanced Experimental Medical Biology. — 1990. — Vol. 264, №1. — P. 79-84.
11. *Shi E., Jiang X., Wang L.* и др. Intrathecal injection of hepatocyte growth factor gene-modified marrow stromal cells attenuates neurologic injury induced by transient spinal cord ischemia in rabbits // Anesthesiology. — 2010. — Vol. 113, №5. — P. 1109-1117.
12. *Xue F., Zhang J.J., Xu L.M.* и др. Protective effects of HGF-MSP chimera (metron factor-1) on liver ischemia-reperfusion injury model // Journal of digestive Diseases. — 2010. — Vol. 11, №5. — P. 299-305.

Поступила 12.10.11

### Сведения об авторах:

*Ляшев Юрий Дмитриевич*, д-р мед. наук, проф. каф. патофизиологии ГБОУ ВПО КГМУ Минздрава России

*Корозин Василий Игоревич*, асс. каф. ортопедической стоматологии ГБОУ ВПО КГМУ Минздрава России



© И.П. Кайдашев  
УДК 616-008

И.П. Кайдашев

## Активация ядерного фактора *kB* как молекулярной основы патогенеза метаболического синдрома

Высшее государственное учебное заведение Украины «Украинская медицинская стоматологическая академия»,  
Украина, Полтава, 36024, ул. Шевченко, 23

*Представлен анализ современных данных о возникновении и развитии патологического состояния при наличии совокупности эволюционно новых причинных факторов. Приводится сравнительная оценка наиболее общепринятых определений понятия «метаболический синдром» и критериев постановки диагноза данного патологического процесса. Сформулирована концепция перманентной активации *NF-kB* в качестве возможного типового патологического процесса. Рассматривается участие данного фактора в возникновении и формировании «порочного круга»: инсулинорезистентность — воспаление — атеросклероз.*

**Ключевые слова:** метаболический синдром, инсулинорезистентность, *NF-kB*

I.P. Kaidashev

## Conception for permanent activation of nuclear factor *kB* as molecular basis for metabolic syndrom pathogenesis

Ukrainian Medical Stomatological Academy, 23, Shevchenko str., Poltava, Ukraine

*The analysis of new data concerning the development of pathology due to the community of evolutionary new pathological factors was done. Author provides the comparison of well-known and new definition for «metabolic syndrome» and diagnostic criteria of this pathology. The conception for permanent activation of nuclear factor *kB* as possible typical pathological process was discussed. Suppose that *NF-kB* is the possible key molecule in the initiation and formation of «vicious circle» — insulinresistance — inflammation — atherosclerosis.*

**Key words:** metabolic syndrome, insulinresistance, nuclear factor *kB*

«Одна из важных задач патологической физиологии состоит в том, чтобы дать научное определение болезни, раскрыть содержание этого понятия. От правильного взгляда на сущность болезни зависит успешное исследование общих закономерностей её возникновения и развития, что, в свою очередь, необходимо для профилактики и лечения», писал Д.Е. Альперн [1]. В его определении: «Болезнь — это сложная реакция организма на действие болезнетворного агента, качественно новый процесс жизнедеятельности, возникающий вследствие расстройства взаимодействия организма с окружающей средой, характеризующийся ограничением или нарушением регуляции функций и приспособляемости, уменьшением работоспособности и полезной трудовой деятельности». В то же время необходимо отличать понятия «патологический процесс» и «патологическое состояние».

**Для корреспонденции:** Кайдашев Игорь Петрович, д-р мед. наук, проф., проректор по научной работе, зав. каф. внутренних болезней с уходом за больными ВГУЗ Украины «УМСА». E-mail: kaidashev@yandex.ru

С точки зрения рассматриваемой проблемы, также необходимо коснуться определения понятия «этиология». Под этиологией болезни понимают как причину, так и весь комплекс условий, при наличии которых причина проявляет свое болезнетворное действие на организм [1].

Незначительно отличаются взгляды на эти понятия и в более поздних работах классиков отечественной патофизиологии. «Болезнь есть нарушение нормальной жизнедеятельности организма при действии на него повреждающих агентов, в результате чего понижаются его приспособительные возможности» [6]. В то же время начинает употребляться термин «факторы риска». Это помогает из огромного количества внутренних и внешних факторов выделять такие, которые имеют ближайшее отношение к формированию данного заболевания. При этом следует иметь в виду, что к факторам риска относятся такие, которые являются причинами или условиями, или даже звеньями патогенеза данного заболевания, требующими дальнейшего разделения и самостоятельного анализа.

Конец второго тысячелетия вследствие бурного развития информационных технологий, переосмысления

огромного массива накопленных знаний в области общей патологии охарактеризован появлением новых определений понятия «болезнь». В понятие первичного повреждения при болезни включаются также дефекты управления, нарушения информационных процессов в организме. Болеет всегда организм как целое. Именно это имели в виду Г. Риккер, утверждающий, что болезнь может начинаться с «нарушения отношений в организме», Н.М. Амосов с его положением о болезни, как о «нарушении в организме обратных связей, состоянии неустойчивого режима или дефектов собственных программ», Ф. Хофф, считавший имманентным признаком «болезни вообще» нарушение управления [3].

Наиболее универсальные из стереотипных строительных блоков спонтанных болезней запрограммированы в генетическом аппарате организма и называются типовыми патологическими процессами. Типовые патологические процессы сложились эволюционно и генетически запрограммированы, они обладают стереотипностью, универсальностью, относительным полиэтиологизмом и аутохтонностью, эквивинальностью, а также характерной онтогенетической динамикой.

Поскольку типовые патологические процессы — эволюционно отобранные программы, мы можем проследить их филогенез и обнаружить их в том или ином виде у различных животных. Эволюционные находки, возникшие на ранних этапах филогенеза типового патологического процесса, не пропадают на последних стадиях, а интегрируются в более сложный процесс как его неотъемлемые компоненты, иногда обогащая свою роль новыми функциями.

Эволюционно организм человека приобретал способности реагировать на различные экзогенные и эндогенные факторы, которые преимущественно представлены экстремальными негативными: недостаток питательных веществ, механические повреждения, термические факторы, волновые воздействия, химические факторы, инфекционные агенты (преимущественно бактерии), психосоциальные факторы и т.д.

В современных условиях развития цивилизации человек сталкивается с изменениями влияющих факторов. Недостаток питательных веществ сменяется их избытком с преобладанием легко усваиваемых углеводов; рафинированных жирных кислот; минимизируются механические повреждения; уменьшается диапазон воздействующих температур; изменяется спектр волновых воздействий; увеличиваются число и концентрации биологически активных ксенобиотиков. Изменяется спектр микроорганизмов, воздействующих на современного человека — уменьшается число бактериальных инфекций при увеличении вирусных и внутриклеточных («гигиеническая теория» развития аллергических заболеваний). Увеличивается продолжительность «искусственного светового дня».

Такое новое сочетание влияющих на человека факторов приводит к необходимости использования уже существующих эволюционно закрепленных типовых реакций, так как быстрое развитие цивилизации не оставляет достаточно времени для эволюционирования новых механизмов или новых регуляторных/управляющих систем и механизмов с целью их «подстройки», «тюнинга» в новых условиях существования.

Таким образом, в современных условиях формируется совокупность эволюционно новых причинных факторов, которые могут вызывать новое патологическое состояние (болезнь?), реализуясь через эволюционно закрепленные типовые патологические процессы, но с определенной специфичностью.

В связи с этим необходимо вспомнить ставший классическим труд В.П. Петленко и соавт. «Детерминизм и теория причинности в патологии» (1976), подчеркивающий, что причина любого патологического процесса или болезни всегда имеет две стороны. Данная концепция настаивает на включении в процесс такого элемента организма, который избирательно реагирует на данный причинный фактор. Согласно этой точке зрения, с начала происходит комплементарное взаимодействие патогенного агента с распознающим механизмом, а в ряде случаев — действие агента и элемента реактивности организма друг на друга, порождающие этиологические агенты второго порядка.

Соответственно, если на организм начинает воздействовать новая эволюционно не закрепленная группа факторов, то это неизбежно приведет к развитию патологического состояния с новым набором типовых патологических процессов, соответственно, это может быть истолковано и как новое отдельное заболевание.

В современных условиях такая группа факторов включает в себя снижение физической активности, избыточное поступление с пищей легко усваиваемых углеводов, рафинированных жиров, изменение спектра инфекционных агентов и т.д. Соответственно, каждый из этих факторов, по отдельности и в совокупности воздействуют на организм, вступая во взаимодействие с первичными элементами организма, вызывают гиподинамию, явления инсулинорезистентности, липотоксичности, ожирения, иммунного воспаления и т.д. При этом очередность возникновения этих связанных между собой явлений определяется реактивностью организма, которая включает в себя весь набор доступных организму адаптивных ответов, в том числе все унаследованные нормы реакции, а также ненаследуемые программы, связанные с индивидуальным онтогенетическим опытом и сохраняемые иммунологической памятью и нейропамятью.

В значительной степени ведущие проявления такого нового патологического процесса будут зависеть от индивидуальной реактивности организма, индивидуальных дефектов клеточных программ (наследствен-

ных и врожденных), которые могут проявляться на различных этапах онтогенеза.

Например, в развитии артериальной гипертензии важную роль могут играть полиморфизмы генов, кодирующих белки ренин-ангиотензиновой системы, инсулинорезистентности — полиморфизмы генов, кодирующих рецепторы, активизирующие пролиферацию пероксисом и т.д., модулирование иммунного воспаления — полиморфизм генов Toll-подобных рецепторов [4, 5]. Однако начало реализации взаимодействия одного из группы воздействующих этиологических факторов не исключает дальнейшего действия остальных и постепенной, последовательной их реализации. Более того, однажды запущившись действием ведущего этиологического фактора, патологический процесс легко активируется остальными, вызывая формирование порочного круга.

Остановившись на некоторых понятиях физиологии, касающихся непосредственной темы изложения, перейдем к анализу понятия «метаболический синдром» и его составляющих.

Метаболический синдром (МС) представляет собой, в определениях ведущих международных клинических организаций, комплекс взаимосвязанных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) и диабета. Эти факторы включают дисгликемию, повышенное кровяное давление, повышенный уровень триглицеридов, низкий уровень холестерина липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) и ожирение (особенно центральное). В настоящее время внимание сосредоточено на возможной роли инсулинорезистентности как связующего звена среди факторов, составляющих МС. Тем не менее, патогенез остается не ясным, как и установление четких диагностических критериев [16]. Четко показано, что эти факторы риска, объединенные в МС, широко распространены, и распространенность растет по всему миру вследствие увеличения численности людей с ожирением и неправильным образом жизни. Таким образом, МС является комплексной медицинской и социальной проблемой.

Несмотря на то, что ожирение и его осложнения (в том числе МС) вызывают настороженность широких масс клиницистов, остается много неясного в терминологии и диагностических критериях МС. Консенсус может быть достигнут, если термин МС использовать для описания состояния, при котором присутствует множество факторов риска развития ССЗ и диабета. С другой стороны, предложено достаточно много определений для МС. Это привело к некоторому несоответствию диагнозов МС, которые устанавливаются на основании различных критериев. Дискутируется важный вопрос — является ли действительно МС синдромом или совокупностью разнородных феноменов. Обратимся к определению понятия синдром, используемое международными организациями. Синдромом обозначают объединение факторов, которые наблюдаются вместе чаще, чем по отдель-

ности, и для которых причина часто не установлена. Такое определение синдрома, с нашей точки зрения, является весьма неудачным. Тем не менее, метаболический синдром, по мнению таких авторитетных организаций как IDF (Международная диабетическая федерация), АНА (Американская сердечная ассоциация), IAS (Международное атеросклеротическое общество) и др., вполне отвечает этим критериям [10]. Пациенты с МС имеют удвоенный риск развития ССЗ в последующие 5—10 лет по сравнению с лицами, не страдающими этим синдромом. МС приводит к 5-кратному увеличению риска заболевания сахарным диабетом (СД) 2 типа. Наиболее часто используются такие метаболические факторы риска как атерогенная дислипидемия, повышенное артериальное давление (АД) и гипергликемия. Кроме того, лица, у которых наблюдаются такие факторы риска, обычно демонстрируют наличие протромботических и провоспалительных состояний.

Первое формальное определение МС было предложено в 1998 г. консультационной группой по определению диабета для ВОЗ [8]. В этом определении инсулинорезистентность была подчеркнута как основной фактор риска и доказательство наличия этого симптома было необходимым для постановки диагноза МС. Диагноз МС по критериям ВОЗ (1998) базировался на нескольких маркерах инсулинорезистентности и двух дополнительных факторах риска, включая ожирение, гипертензию, высокий уровень триглицеридов, сниженный уровень холестерина ЛПВП или микроальбуминемии. Больные с СД 2 типа не были исключены из диагноза МС (табл. 1).

Затем были предложены в 2001 г. критерии АТР III (National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III) [29]. Критерии АТР III не требовали доказательства присутствия инсулинорезистентности. Более того, не было одного обязательного фактора, а требовалось наличие любых трех из пяти факторов: абдоминальное ожирение (которое четко коррелировало с инсулинорезистентностью), повышенные уровни триглицеридов, сниженный уровень холестерина ЛПВП, повышенное АД и повышенная концентрация глюкозы натощак (или СД 2 типа) (табл. 2).

В 2005 г. Международная диабетическая (IDF) и Американская сердечная ассоциация совместно с Национальным институтом сердца, легких и крови (АНА/NHLBI) приняли новые критерии для клинической диагностики МС [9, 23]. В этих критериях имеются отличающиеся рекомендации относительно окружности талии. IDF опустила требования ВОЗ (1998) относительно инсулинорезистентности, но сделала абдоминальное ожирение одним необходимым фактором из пяти для постановки диагноза, с особым ударением на измерении талии как простом методе скрининга; остальные критерии были идентичны АТР III критериям, но не выдвинули

абдоминальное ожирение как обязательный фактор риска. Более того, отсутствует согласованное определение абдоминального ожирения между IDF и АНА/NHLBI. IDF рекомендовала порог для окружности талии как признак абдоминального ожирения для жителей Европы  $\geq 94$  см для мужчин и  $\geq 80$  для женщин; АНА/NHLBI предложили  $\geq 102$  и  $\geq 88$  см, соответственно. Последние показатели соответствуют определению абдоминального ожирения руководства по ожирению Национального института здоровья (НИН, США), что составляет ИМТ приблизительно  $30 \text{ кг/м}^2$  у мужчин. Показатели IDF ближе к ИМТ около  $25 \text{ кг/м}^2$  у мужчин. В настоящее время дискуссия между IDF и АНА/NHLBI по вопросу различий в определении МС продолжаются. Стороны сходятся в том, что абдоминальное ожирение не должно быть определяющим в установлении диагноза, а лишь 1 из пяти критериев, присутствие любых трех из пяти факторов является достаточным для диагностики МС (табл. 3).

Как видно из первой графы табл. 3, для определения порогового значения необходимо пользоваться величинами, специфичными для популяции или страны. Несколько авторитетных международных организаций предложили такие значения для разных этнических групп, стран.

Таким образом, в табл. 3 представлены наиболее общепринятые критерии постановки диагноза МС, предложенные IDF и АНА/NHLBI (2009). Это определение предполагает, что риск, связанный с увеличением окружности талии будет определяться отдельно для каждой популяции. Устанавливать ли в настоящее время предел, с которого начинает возрастать риск, или с которого определяется уже существенный риск будет решать согласно рекомендации каждая национальная экспертная группа. Тем не менее, важным является то, чтобы подходы к изучению этиологии, установлению диагноза (критерии) с согласованными пороговыми значениями для каждой этнической группы были сравнимы. Однако современный мир в большой степени состоит из людей смешанной этничности, что еще более затрудняет установление пороговых значений.

Согласно замечаниям экспертов, ожидается создание новой экспертной группы WHO и NHLBI для установления пороговых значений окружности талии.

Несомненно, что учение о МС будет эволюционировать. Развиваться будут не только точка зрения на взаимоотношение значения окружности талии, метаболического риска и сердечно-сосудистых событий,

Критерии метаболического синдрома согласно ВОЗ (1998)

Таблица 1

Инсулинорезистентность, установленная одним из перечисленных признаков	СД 2 типа Измененный уровень глюкозы натощак Нарушение толерантности к глюкозе или те пациенты с нормальным уровнем глюкозы (<110 мг/дл), захват глюкозы у которых менее нижнего квартиля для основной популяции при исследовании эугликемии
С присутствием двух любых дополнительных факторов из перечисленных	Прием антигипертензивных препаратов и/или повышенное АД ( $\geq 140$ мм рт. ст. систолическое или $\geq 90$ мм рт. ст. диастолическое) Концентрация триглицеридов в плазме $\geq 150$ мг/дл ( $\geq 1,7$ ммоль/л) Холестерин ЛПВП <35 мг/дл (<0,9 ммоль/л) у мужчин или <39 мг/дл (<1,0 ммоль/л) у женщин ИМТ $> 30 \text{ кг/м}^2$ и/или отношение окружностей талии/бедра $> 0,9$ у мужчин, $> 0,85$ у женщин Экспрессия альбумина с мочой $\geq 20$ мкг/мин или соотношение альбумин/креатин $\geq 30$ мг/г

Критерии метаболического синдрома согласно АТР  $\square\square\square$  (2001)

Таблица 2

Фактор риска	Определяющий уровень
Абдоминальное ожирение* представленное как окружность талии	$\geq 102$ см у мужчин $\geq 88$ см у женщин
Триглицериды	$\geq 150$ мг/дл
Холестерин ЛПВП	<40 мг/дл у мужчин <50 мг/дл у женщин
Артериальное давление	$\geq 130/85$ мм рт. ст.
Уровень глюкозы натощак **	$\geq 110$ мг/дл

Примечание. \* избыточный вес и ожирение ассоциированы с инсулинорезистентностью и МС. Наличие абдоминального ожирения более четко коррелирует с метаболическими факторами риска, чем повышенный индекс массы тела (ИМТ). Отдельные пациенты мужского пола могут проявлять метаболические факторы риска даже при пограничном увеличении окружности талии (94—102 см). \*\* Американская диабетическая ассоциация установила пограничное значение  $\geq 110$  мг/дл, выше которого люди относятся или к предиабету или диабету.

но и взгляды на этиологию и патогенез МС. Анализ составляющих МС показывает, что с момента описания этого состояния произошел определенный «дрейф» значимости компонентов от инсулинорезистентности в сторону ожирения.

При этом проблему ожирения, и тем более с точки зрения патогенеза МС, трудно признать полностью изученной. Доказана гетерогенность ожирения, описаны лица с ожирением, но без признаков характерных гормонально-метаболических нарушений, и лица с нормальной массой тела, но с подобными нарушениями. При этом предрасположенность к основным неинфекционным заболеваниям (например, ишемической болезни сердца/атеросклерозу) у «метаболически здоровых лиц с ожирением» ниже, чем у лиц с нормальным весом и метаболическими нарушениями, но все-таки они находятся в большей зоне риска, чем люди с нормальной массой тела без признаков метаболических нарушений [2].

Таким образом, ожирение само по себе является фактором, осложняющим гормонально-метаболические нарушения, но не определяющим развитие МС самостоятельно.

Если проследить пространственно-временную взаимосвязь событий в патогенезе МС, то на первый план выходят такие патологические состояния как гипергликемия, гиперинсулинемия, инсулинорезистентность, эндотелиальная дисфункция и атеросклероз, липотоксичность, воспаление, адипозопатия и нарушение топографии жира в организме.

Итак, гипергликемия, традиционно рассматриваемая как важный фактор сердечно-сосудистых нарушений, в результате проведенных широкомасштабных клинических исследований, доказавших, что активная нормализация уровня глюкозы в крови не приводит к снижению риска развития ССЗ, сегодня представляется второстепенным фактором по сравнению с дисли-

пидемией и гипертензией [21, 30]. Клинические наблюдения применения инсулина с целью предотвращения развития ССЗ показали его неэффективность. Инсулин вызывает увеличение массы тела, преимущественно за счет жировой ткани [25]. Более того, даже небольшое увеличение уровня инсулина в плазме может вызывать тяжелую инсулинорезистентность [17]. Существует множество опубликованных исследований, показывающих, что инсулин, особенно в высоких дозах, провоцирует развитие атеросклероза, усиливает липогенез *de novo* и повышает синтез ЛПОНП в печени, усиливает транспорт ЛПНП в гладкомышечные клетки артерий, синтез коллагена, стимулирует пролиферацию гладких миоцитов, а также, что особенно важно, запускает экспрессию множества генов, регулирующих процессы воспаления [14]. В свете вышеприведенных факторов гиперинсулинемия и инсулинорезистентность становятся одним из основных звеньев патогенеза. Сама по себе инсулинорезистентность и связанные с ней процессы могут являться причинами развития ССЗ [27, 31]. Были получены результаты, согласно которым пациенты с СД 2 типа и нормальным весом, а также лица с ожирением и нормальной толерантностью к глюкозе, имеют проявления инсулинорезистентности с нарушением пути синтеза гликогена [11]. Получены и подтверждены данные о наличии инсулинорезистентности уже при нарушении толерантности к глюкозе и даже еще до наблюдаемых нарушений толерантности [7, 24].

Возникает обоснованный вопрос о возможности использования понятия инсулинорезистентности в качестве основы синдрома [16]. Такая возможность подтверждена многими клиническими исследованиями — San Antonio Heart Study, Verona Diabetes Study, Insulin Resistance Atherosclerosis Study и др., доказывающими связь между инсулинорезистентностью и развитием ССЗ, в частности атеросклероза.

Таблица 3

Критерии метаболического синдрома согласно IDF и АНА/NHLBI (2005 г. с модификацией 2009 г.)

Фактор риска	Определяющий уровень
Увеличение окружности талии	Значение определяется специфически для страны или популяции
Повышение уровня триглицеридов (альтернативно, использование препаратов, снижающих уровень триглицеридов)*	≥150 мг/дл (1,7 ммоль/л)
Сниженный уровень холестерина ЛПВП (альтернативно, использование препаратов, для сниженного холестерина ЛПВП) *	<40 мг/дл (1,0 ммоль/л) у мужчин <50 мг/дл (1,3 ммоль/л) у женщин
Повышенное артериальное давление (альтернативно, прием антигипертензивных препаратов)	≥130 мм рт. ст. систолическое и/или ≥85 мм рт. ст. диастолическое
Повышение уровня глюкозы натощак (альтернативно, прием сахароснижающих препаратов) **	≥100 мг/дл

Примечание. \* наиболее широко применяемыми препаратами для лечения повышенного уровня триглицеридов и сниженного холестерина ЛПВП являются фибраты и никотиновая кислота. Применение высоких доз ω-3 жирных кислот предполагает высокий уровень триглицеридов; \*\* большинство пациентов с СД 2 типа согласно предложенного критерия будут иметь и МС.

В связи с этим на первый план выступает определение молекулярных основ инсулинорезистентности. Инсулин реализует биологические эффекты путем связывания со специфическими рецепторами клеточной мембраны, активизируются вторичные посредники, которые инициируют каскад фосфорилирования/дефосфорилирования, стимулирующий транспорт глюкозы (через GLUT 4), фосфорилирование глюкозы (через гексокиназу II), гликогенсинтетазу (контролирует синтез гликогена), фосфофруктокиназу и пируватдегидрогеназу (регулируют гликолиз и окисление глюкозы). В мышцах связывание инсулина с рецепторами приводит к фосфорилированию по тирозину IRS-1 (субстрат инсулинового рецептора 1), который опосредует эффекты инсулина, направленные на обмен глюкозы. В печени инсулин реализует свои эффекты через IRS-2. Инсулин имеет важное значение в активации синтазы оксида азота, регулирующей продукцию NO. Дефицит NO приводит к активации множества патогенетических механизмов развития атерогенеза [28]. Таким образом, нарушение передачи инсулинового сигнала не только нарушает утилизацию глюкозы, но и инициирует развитие гипертензии и атеросклероза.

В условиях инсулинорезистентности нарушается передача сигнала от инсулинового рецептора IRS-1 к фосфоинозитол-3-киназе (PI-3K), которая регулирует нормальный метаболизм глюкозы. При этом сохраняется передача сигнала по MAP (митоген-активируемая протинкиназа) -киназному пути, после взаимодействия между IRS-1 и адапторным белком переносящем сигнал от рецепторов (SHC) активируется внеклеточнорегулируемая киназа (ERK), транслоцируется в ядро и фосфорилирует транскрипционные факторы [32]. Соответственно, инсулинорезистентность в PI-3-киназном (метаболическом) пути при сохранном MAP-киназном активирует многие провоспалительные внутриклеточные пути, включая NF-kB/ингибитор kB и c-Jun N-концевую киназу (фосфорилирование белка Jun — компонента фактора транскрипции), и гены, участвующие в воспалении [14].

Важным является также и то, что нарушение PI-3-киназного пути при инсулинорезистентности приводит к снижению продукции NO, так как синтаза оксида азота активируется тем же PI-3-киназным путем. Нарушение продукции NO, в свою очередь, вызывает развитие эндотелиальной дисфункции и возникновение атеросклероза [13].

Итак, приведенные данные позволяют четко проследить следующую последовательность событий: инсулинорезистентность — воспаление — атеросклероз. Однажды возникший и зафиксировавшийся дефект инсулиновой сигнализации инициирует «порочный круг». Нарушенная утилизация глюкозы вызывает гипергликемию, которая стимулирует секрецию

инсулина. Вследствие нарушения PI-3-киназного пути наблюдается избыточная стимуляция MAP-киназного пути, что усугубляет тяжесть нарушения PI-3-киназного пути. Результатом продолжительной стимуляции MAP-киназного пути является пролиферация клеток гладкой мускулатуры сосудов, усиление продукции коллагена, избыточная продукция ростовых факторов и воспалительных цитокинов, все это приводит к развитию атеросклероза.

Чрезвычайно важным фактором является участие ядерного транскрипционного фактора NF-kB в этих процессах. Например, гиперинсулинемия удваивает способность ангиотензина II в сосудистых гладкомышечных клетках трансактивировать NF-kB [22]. При этом NF-kB активирует множество воспалительных путей, участвующих в патогенезе атеросклероза, вызывает фосфорилирование по серину IRS-1, что ингибирует передачу инсулинового сигнала [19]. Это является очень важным, так как сама активация NF-kB может приводить к инсулинорезистентности и наоборот. Более того, ангиотензин II не только приводит к активации NF-kB, но и вызывает фосфорилирование по серину IRS-1, тем самым нарушая утилизацию глюкозы и провоцируя инсулинорезистентность [18].

С точки зрения общей патологии возникает закономерный вопрос: нарушения передачи инсулинового сигнала определяются наследственными или приобретенными дефектами? Несомненно, что ответ будет компромиссным. Многие гены включаются в регуляцию обмена глюкозы, MAP-киназного и PI-3-киназного путей, NF-kB сигнализацию, регуляцию сосудистого тонуса и т.д. Соответственно, наследственные изменения этих генов, ряд эпигеномных воздействий могут влиять на активность продуктов этих генов. Возвращаясь к причинам возникновения гипергликемии, гиперинсулинемии, инсулинорезистентности, воспалительной реакции, нельзя еще раз не подчеркнуть важность изменения условий жизнедеятельности современного человека (избыток питания, гиподинамия, стресс, дисбаланс инфекций и т.д.).

Одним из важных патологических звеньев анализируемого процесса является так называемая липотоксичность, нарушение обмена глюкозы под действием накопленной жировой ткани [33]. По-сути, липотоксичность рассматривается в более широком смысле: повышенный уровень неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) в плазме, повышенное содержание жиров в тканях, нарушение топографии жировой ткани в организме, адипозопатия. Внутриклеточные токсические метаболиты обмена триацилглицерина и НЭЖК (диацилглицерин, церамиды, ЖК-ацил CoA) вызывают явления выраженной инсулинорезистентности путем нарушения передачи инсулинового сигнала и нарушений многих механизмов

обмена глюкозы [26]. Эти же патологические изменения тесно связаны с низкоинтенсивным хроническим воспалением [20]. Одной из ключевых молекул, реализующих провоспалительные реакции в клетках, является транскрипционный фактор NF-κB, одновременно участвующий в развитии инсулинорезистентности. Каскад событий упрощенно можно представить в следующем виде: после активации провоспалительными факторами (в том числе ЖК-ацил CoA) свободный NF-κB перемещается в ядро и связывается с κB последовательностями ДНК, стимулируя синтез ФНО-α, IL-1β, IL-6, PКС; в свою очередь фактор некроза опухоли (ФНО-α), IL-6, PКС вызывают фосфорилирование по серину IRS-1, ингибируя передачу инсулинового сигнала и вызывая инсулинорезистентность [15]. Многие вещества липидной природы, включая НЭЖК, могут связываться с мембранными рецепторами, например, TLR4 (толл-подобный рецептор), и активировать NF-κB.

Липотоксичность может проявляться и в форме «адинопатии» [12]. Адипоциты продуцируют ряд биологически активных веществ, которые влияют на состояние миоцитов, гепатоцитов, эндотелиоцитов (адипокины). При этом жировая ткань лиц с ожирением и больных СД2 типа инфильтрирована мононуклеарными клетками и находится в состоянии хронического воспаления. Адипоциты и инфильтрирующие моноциты/макрофаги секретируют ФНО-α, резистин, IL-6, ингибитор активатора плазминогена-1, ангиотензиноген, которые индуцируют инсулинорезистентность и усиливают атерогенез. Нарушение топографии жира в организме (в частности, накопление интраабдоминального жира, висцерального жира) также связывается с инсулинорезистентностью и развитием поражения сердечно-сосудистой системы. Хотя, как указывалось выше, этот признак встречается далеко не у всех пациентов.

Таким образом, приведенные выше соображения подтверждают, что инсулинорезистентность, хроническое воспаление, артериальная гипертензия, эндотелиальная дисфункция и дислипидемия являются взаимосвязанными проявлениями одного патологического процесса, центральной молекулярной основой которого является активация NF-κB (рисунок).

Анализируя сам термин «метаболический синдром», его нельзя признать удачным для обозначения описываемого состояния. Тем более, нельзя рассматривать этот патологический процесс как совокупность отдельных несвязанных факторов риска ССЗ. В данном случае речь идет о совокупности признаков, которые в силу общего механизма возникновения объединяются друг с другом закономерным и регулярным образом, характеризуя определенное болезненное состояние организма.



NF-κB как молекулярная основа патологического процесса при метаболическом синдроме

Учитывая, что все признаки, составляющие «метаболический синдром», имеют общую молекулярную основу, связанную с активацией NF-κB, предлагается на современном этапе сформулировать концепцию перманентной активации NF-κB в качестве возможного типового патологического процесса.

Создание такой концепции, ее экспериментальное и клиническое подтверждение раскроют широкие перспективы углубления знаний о патогенезе таких распространенных заболеваний как СД2 типа, ишемическая болезнь сердца и атеросклероз, гипертензия и ожирение, соответственно намечая новые направления в экспериментальной терапии и фармакологии.

### Список литературы

1. Альперн Д.Е. Патологическая физиология. — М.: Медицина, 1965. — 434 с.
2. Берштейн Л.М., Коваленко И.Г. «Метаболически здоровые» лица с ожирением и метаболические признаки ожирения у лиц с нормальной массой тела: что за этим стоит? // Проблемы эндокринологии. — 2010. — №3 — С. 47-51.
3. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Основы общей патологии. Часть 1. Основы общей патофизиологии. — СПб.: ЭЛБИ, 1999. — 624 с.
4. Кайдашев І.П., Расін М.С., Нерух І.А. та ін. Поліморфізм гена рецептора ангіотензину II першого типу визначає тяжкість перебігу ренопаренхіматозної гіпертензії // Кровообіг та гемостаз. — 2006. — №2. — С. 54-57.
5. Кайдашев І.П., Куценко Л.О., Шликова О.А. та ін. Вивчення поширеності Pro12Ala поліморфізму гена ППАР-γ2 в українській популяції з симптомами мета-

болічного синдрому // Міжнародний ендокринологічний журнал. — 2008. — №1 (13). — С. 23-26.

6. Патологическая физиология / Под ред. чл.-корр. АМН СССР Н.Н. Зайко. — К.: Вища школа, 1985. — 575 с.

7. **Abdul-Ghani M.A., Jenkinson C.P., Richardson D.K.** et al. Insulin secretion and action in subjects with impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: results from the Veterans Administration Genetic Epidemiology Study (VAGES) // *Diabetes*. — 2006. — Vol. 55. — P. 1430-1435.

8. **Alberti K., Zimmer P.** Definition, diagnosis and classification of Diabetes mellitus and its complications, part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus, provisional report of a World Health Organization consultation // *Diabet. Med.* — 1998. — Vol. 15. — P. 539-553.

9. **Alberti K.G., Zimmer P., Shaw J.** IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The Metabolic Syndrome - a new worldwide definition // *Lancet*. — 2005. — Vol. 366. — P. 1059-1062.

10. **Alberti K.G., Eckel R.H., Grundy S.M.** et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity // *Circulation*. — 2009. — Vol. 120. — P. 1640-1645.

11. **Bajaj M., De Fronzo R.A.** Metabolic and molecular basis of insulin resistance // *J. Nucl. Cardiol.* — 2003. — Vol. 10. — P. 311-323.

12. **Bays H., Mandarino L., De Fronzo R.A.** Role of the adipocytes, FFA, and ectopic fat in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: PPAR agonists provide a rational therapeutic approach // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2004. — Vol. 89. — P. 463-478.

13. **Behrendt D., Ganz P.** Endothelial function. From vascular biology to clinical applications // *Am. J. Cardiol.* — 2002. — Vol. 21. — P. 40L-48L.

14. **Coletta D.K., Balas B., Chavez A.O.** et al. Effect of acute physiological hyperinsulinemia on gene expression in human skeletal muscle in vivo // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* — 2008. — Vol. 294. — P. E910-E917.

15. **De Alvaro C., Teruel T., Hernandez R.** et al. Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappa B kinase in a p38 mark-dependent manner // *J. Biol. Chem.* — 2004. — Vol. 279. — P. 17070-17078.

16. **DeFronzo R.A.** Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis : the missing links. The Claude Bernard lecture 2009 // *Diabetologia*. — 2010. — Vol. 53. — P. 1270-1287.

17. **Del Prato S., Leonetti F., Simonson D.C.** Effect of sustained physiologic hyperinsulinaemia and hyperglycaemia on insulin secretion and insulin sensitivity in man // *Diabetologia*. — 1994. — Vol. 37. — P. 1025-1035.

18. **Folli F., Kahn C.R., Bouchie J.** et al. Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels // *J. Clin. Invest.* — 1997. — Vol. 100. — P. 2158-2169.

19. **Gao Z., Hwang D., Bataille F.** et al. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277. — P. 48115-48121.

20. **Garg R., Tripathy D., Dandona P.** Insulin resistance as a proinflammatory state: mechanisms, mediators, and the-

rapeutic interventions // *Curr. Drug Targets*. — 2003. — Vol. 4. — P. 487-492.

21. **Gerstein H.C., Miller M.E., Byington R.P.** et al. Effects of intensive glucosae lowering in type 2 diabetes // *N. Engl. J. Med.* — 2008. — Vol. 358. — P. 2345-2359.

22. **Golovchenko I., Goalstone M.L., Watson P.** et al. Hyperinsulinemia Enhances Transcriptional Activity of Nuclear Factor-kB Induced by Angiotensin II, Hyperglycemia, and Advanced Glycosylation End Products in Vascular Smooth Muscle Cells // *Circ. Res.* — 2000. — Vol. 87. — P. 746-762.

23. **Grundy S.M., Cleeman J.I., Daniels S.R.** et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement // *Circulation*. — 2005. — Vol. 112. — P. 2735-2752.

24. **Gulli G., Ferrannini E., Stern M.** et al. The metabolic profile of NIDDM is fully established in glucose-tolerant offspring of two Mexican-American NIDDM parents // *Diabetes*. — 1992. — Vol. 41. — P. 1575-1586.

25. **Holman R.R., Thorne K.I., Farmer A.J.** et al. Addition of Biphasic, Prandial, or Basal Insulin to Oral Therapy in Type 2 Diabetes // *N. Engl. J. Med.* — 2007. — Vol. 357. — P. 1716-1730.

26. **Kashyap S., Belfort R., Berria R.** et al. Discordant effects of a chronic physiological increase in plasma FFA on insulin signaling in healthy subjects with or without a family history of type 2 diabetes // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* — 2004. — Vol. 287. — P. E537-E546.

27. **Miranda P.J., DeFronzo R.A., Califf R.M.** et al. Metabolic syndrome: evaluation of pathological and therapeutic outcomes // *Am. Heart J.* — 2005. — Vol. 149. — P. 20-45.

28. **Naruse K., Shimizu K., Muramatsu M.** et al. Long-term inhibition of NO synthesis promotes atherosclerosis in the hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. PGH2 does not contribute to impaired endothelium-dependent relaxation // *Arterioscler Thromb.* — 1994. — Vol. 14. — P. 746-752.

29. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report // *Circulation*. — 2002. — Vol. 106. — P. 3143-3421.

30. **Patel A., MacMahon S., Chalmers J.** et al. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes // *New Engl. J. Med.* — 2008. — Vol. 358. — P. 2560-2725.

31. **Reaven G.M.** Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease // *Diabetes*. — 1988. — Vol. 37. — P. 1594-1607.

32. **Taniguchi C.M., Emanuelli B., Kahn C.R.** Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2006. — Vol. 7. — P. 85-96.

33. **Unger R.H.** Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome // *Trends Endocrinol. Metab.* — 2003. — Vol. 14. — P. 398-403.



Л.Н. Маслов<sup>1,2</sup>

## Сигнальный механизм нейропротекторного эффекта ишемического preconditionирования мозга

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение Научно-исследовательский институт кардиологии Сибирского отделения РАМН, 634012, Томск, ул. Киевская, 111

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Томский государственный педагогический университет, 634061, Томск, ул. Киевская, 60

*Анализ опубликованных данных свидетельствует о том, что в сигнальном механизме отсроченного ишемического preconditionирования важную роль играет белок Ras и киназы: PI3K, Akt, MEK1/2, ERK1/2, PKC, CaMKII. Кроме того, установлено, что в позднем preconditionировании принимают участие циклооксигеназа-2, NO-синтаза, митК<sub>АТФ</sub>-канал. Сигнальный механизм раннего ишемического preconditionирования остаётся неизученным.*

**Ключевые слова:** мозг, ишемия, реперфузия, preconditionирование, сигнальный механизм

L.N. Maslov<sup>1,2</sup>

## Signaling mechanism of neuroprotective effect of ischemic preconditioning of brain

<sup>1</sup> Scientific Research Institute of Cardiology of SB of RAMS, 111a, Kievskaja str., Tomsk, 634012, Russia

<sup>2</sup> Tomsk State Pedagogical University, 60, Kievskaya str., Tomsk, 634061, Russia

*Analysis of published data indicates that Ras-protein and kinases PI3K, Akt, MEK1/2, ERK1/2, PKC, CaMKII are involved in the signaling mechanism of ischemic preconditioning. In addition, it is established that cyclooxygenase-2, NO-synthase and mitK<sub>АТФ</sub>-channel are involved in delayed preconditioning. Signaling mechanism of early ischemic preconditioning of brain is remained unstudied.*

**Key words:** brain, ischemia, reperfusion, preconditioning, signaling mechanism

Известно, что раннее и позднее ишемическое preconditionирование (ИП) мозга оказывает нейропротекторный эффект, механизм которого остаётся недостаточно изученным [7, 18, 26, 28, 29]. Установлено, что эндогенными триггерными факторами ИП мозга являются: аденозин [26], опиоиды [41], глутамат [15], активные формы кислорода [24], эритропоэтин [4].

Общезвестно, что в передаче сигнала в клетке важную роль играют протеинкиназы, поэтому не удивительно, что исследователи, занимающиеся проблемой preconditionирования мозга, в своих работах большое внимание уделяют этим ферментам. Принято считать [5, 33], что выживаемость клеток увеличивается при активации киназных тандемов: PI3K-Akt и MEK1/2-ERK1/2, где PI3K — phosphatidylinositol-3-kinase, Akt — киназа, выделенная из AKR Thymoma cell line, MEK1/2 — mitogen-activated pro-

tein kinase kinase, ERK1/2 — extracellular signal-regulated kinase. Активация большинства киназ происходит за счёт фосфорилирования [5].

### Тандем PI3K-Akt

В 2000 г. S. Namura и соавт. [25] попытались оценить роль Akt в нейропротекторном эффекте preconditionирования у монгольских песчанок, у которых отсутствует Виллизиев круг. Preconditionирование моделировали с помощью билатеральной окклюзии (3,5 мин) обеих сонных артерий с последующей реперфузией. Оказалось, что ИП снижало количество фосфорилированной Akt через 1 мин от момента начала реперфузии [25]. Через 10 мин и 1 ч, напротив, было зафиксировано повышение количества фосфорилированной Akt. Кроме того, авторы воспроизводили ИП с помощью двух сеансов 2-мин перерывки обеих сонных артерий. Через 24 ч после ИП общее количество белка Akt в мозге оставалось неизменным, количество фосфорилированной Akt (Ф-Akt) снижалось [25]. Авторы заключили, что Akt не участвует в preconditionировании мозга. На

**Для корреспонденции:** Маслов Леонид Николаевич, д-р мед. наук, проф., рук. лаб. экспериментальной кардиологии ФГБУ «НИИ кардиологии» СО РАМН. E-mail: maslov@cardio.tsu.ru

наш взгляд, подобный вывод слишком категоричен, потому что через 10 и 60 мин после прекондиционирования отмечалась активация Akt [25]. Возможно, что Akt принимает участие в раннем ИП, которое фиксируется в первые часы после транзиторной ишемии [6], но не участвует в позднем ишемическом прекондиционировании, когда повышение толерантности мозга к ишемии отмечается через 24 ч после прекондиционирования [18]. В 2001 г. S. Yano и соавт. [38] получили данные о том, что Akt участвует в ИП мозга у монгольских песчанок. Ишемическое прекондиционирование моделировали с помощью 2-минутной окклюзии обеих сонных артерий с последующей реперфузией в течение 3 сут., после чего осуществляли 5-минутную перевязку каротидных артерий (летальная ишемия). После декапитации подсчитывали количество жизнеспособных CA1-нейронов гиппокампа. Через 7 сут. после 5-мин окклюзии выживало 15% CA1-нейронов, у прекондиционированных особей — 92% CA1-нейронов. В группе контроля (ишемия без ИП) через 5 мин ишемии количество фосфорилированной Akt снижалось в 6 раз, а через 12 ч реперфузии количество Ф-Akt увеличивалось в 2 раза по сравнению с ложнооперированными особями. У прекондиционированных особей после летальной ишемии и реперфузии не наблюдалось изменения количества Ф-Akt по сравнению с уровнем до 5-минутной окклюзии. Кроме того, авторы оценивали количество Ф-Akt в динамике после ИП. Оказалось, что сразу после ИП уровень Ф-Akt снижается, но затем постепенно увеличивается и достигает максимума через 3 сут. после 2-мин ишемии. Активность Akt возрастала в 2 раза через 3 сут. после ИП, то есть максимум фосфорилирования фермента сопровождался его активацией [38]. Вортманнин (ингибитор PI3-киназы, фосфорилирующей Akt) устранял цитопротекторный эффект ИП и препятствовал увеличению количества Ф-Akt после прекондиционирования. Авторы заключили, что Akt играет важную роль в нейропротекторном эффекте ИП. В 2004 г. группа исследователей опубликовала результаты своих экспериментов по влиянию ИП на фосфорилирование Akt [12]. Прекондиционирование они моделировали с помощью 5-мин окклюзии обеих сонных артерий, через 2 сут. коагулировали обе позвоночные артерии и перекрывали кровоток по каротидным артериям с последующей реперфузией. После 30-мин реперфузии в контроле (ишемия без ИП) количество Ф-Akt в гиппокампе увеличивалось в 4 раза, а у прекондиционированных особей после реперфузии мозга подобного подъема уровня Ф-Akt не наблюдалось [12]. К сожалению, авторы не оценивали уровень Ф-Akt в динамике после ИП и не использовали ингибиторы PI3-киназы, поэтому осталось не ясным, участвует

ли Akt в прекондиционировании. Японские физиологи [27] прекондиционирование мозга у крыс индуцировали с помощью двух сеансов ишемии (10 мин) и реперфузии (10 мин). Ишемию воспроизводили с помощью окклюзии средней мозговой артерии (СМА) и обеих каротидных артерий. Три дня спустя после этой процедуры в течение 1 ч осуществляли окклюзию СМА и сонных артерий (летальная ишемия). Авторам не удалось обнаружить изменения количества Ф-Akt через 3 дня после прекондиционирования. Через 3 ч после летальной ишемии как в группе контроля (ишемия без ИП), так и в группе ИП отмечалось увеличение уровня Ф-Akt, через сутки после ишемии повышенное количество Ф-Akt было зафиксировано только у прекондиционированных особей. Китайским исследователям [23] удалось подтвердить участие Akt в прекондиционировании мозга крысы. Они коагулировали позвоночные артерии, на 3 мин накладывали окклюдеры на обе сонные артерии, через 3 сут. осуществляли 6-мин глобальную ишемию мозга (летальная ишемия). Уровень Ф-Akt в гиппокампе определяли через 10 мин после летальной ишемии. В группе контроля (ишемия без ИП) повышение количества Ф-Akt обнаружить не удалось, в то время как у прекондиционированных особей был зафиксирован подъем уровня Ф-Akt. Ингибитор PI3-киназы LY294002 устранял нейропротекторный эффект ИП и препятствовал реперфузионному увеличению количества Ф-Akt [23, 40]. PI3-киназа фосфорилирует Akt, поэтому представленные данные можно рассматривать как доказательство участия Akt в прекондиционировании. Эти результаты были подтверждены в более поздней работе того же коллектива [42]. Таким образом, большинство публикаций свидетельствует, что нейропротекторный эффект позднего (через сутки и более после ИП) ишемического прекондиционирования связан с активацией Akt. Исследователи из США предполагают [43], что события в клетке после ИП развиваются следующим образом: факторы роста → RTK → PI3K → PIP3 → PDK1 → Akt → BAD, GSK3β → MPT-пора, где RTK — receptor tyrosine kinase, PIP3 — phosphatidylinositol-3-phosphate, PDK1 — phosphoinositol dependent kinase, GSK3β — glycogen synthase kinase 3β, BAD — Bcl-xL/Bcl-2-associated death promoter protein, MPT-пора — mitochondrial permeability transition pore. Названная пора играет важную роль в индукции апоптоза [19]. Открытие этой поры блокирует белок Bcl-2 (B-cell lymphoma protein-2), а способствует её открытию белок BAD [19]. Открытие этой поры сопровождается выходом из митохондрий в цитоплазму цитохрома C и AIF (apoptosis inducing factor), которые индуцируют апоптоз [19]. Фосфорилирование BAD ведёт к его инактивации и, соответст-

венно, к снижению интенсивности апоптоза. Киназа  $GSK\beta$  также участвует в индукции программируемой гибели клетки, ее фосфорилирование ведет к инактивации  $GSK\beta$  и угнетению процесса апоптоза. Следует отметить, что участие в прекондиционировании RTK является пока только гипотезой Н. Zhao и соавт. [43]. Вместе с тем, есть данные, что стимуляция РІЗК во время прекондиционирования происходит за счёт активации NMDA-рецепторов глутаматом [23], где NMDA-рецептор — рецептор N-метил-D-аспартата. Следует отметить, что М. и соавт. [13] в экспериментах на культуре нейронов не удалось подтвердить факт участия РІЗК в ИП. Причина подобного противоречия этих результатов с вышеприведенными данными о важной роли РІЗК в ИП остаётся не ясной.

### Тандем MEK1/2-ERK1/2

Как известно, важную роль в подавлении апоптоза и некроза клеток играет киназный тандем MEK1/2-ERK1/2 [33]. Китайские физиологи индуцировали ИП у крыс с помощью коагуляции позвоночных артерий и 3-мин окклюзии обеих сонных артерий [22]. Через 5 мин реперфузии уровень фосфорилированной ERK1/2 (Ф-ERK1/2) в гиппокампе возрастал в 2 раза по сравнению с интактными особями (контроль). Через 1 сутки количество Ф-ERK1/2 было увеличено в 3 раза, а через 5 сут. — в 2,5 раза. В указанные сроки количество белка ERK1/2 оставалось неизменным. Предварительная инъекция ингибитора NO-синтазы L-NAME ( $N^G$ -Nitro-L-Arginine methyl ester) достоверно снижала подъём уровня Ф-ERK1/2, но не устраняла его полностью. Авторы сделали вывод о том, что прекондиционирование индуцирует фосфорилирование ERK1/2 без усиления синтеза названного фермента, а триггером фосфорилирования ERK1/2 является радикал оксида азота (NO) [22]. Сходные данные получили корейские исследователи [9]. Прекондиционирование они воспроизводили с помощью 3-мин глобальной ишемии мозга крыс. Через 10 мин реперфузии в гиппокампе было обнаружено увеличение уровня Ф-ERK1/2 с последующим снижением до «интактного» уровня через 30 мин реперфузии. Через 3 сут. после ИП авторы обнаружили повторный подъём уровня Ф-ERK1/2 в гиппокампе. Китайские физиологи [37] попытались выяснить, какие эндогенные факторы, наряду с NO, обеспечивают усиление фосфорилирования ERK1/2. Прекондиционирование они моделировали с помощью 3-мин глобальной ишемии мозга крыс, а через 3 сут. воспроизводили 6-мин летальную ишемию. Через 30 мин после летальной ишемии в гиппокампе прекондиционированных особей был зафиксирован достоверный подъём уровня

Ф-ERK1/2, который достигал максимума на 3-е сут. реперфузии и сохранялся на 5-е сут. после возобновления мозгового кровотока. У контрольных особей повышения количества Ф-ERK1/2 после летальной ишемии и реперфузии обнаружить не удалось. К сожалению, авторы не определяли уровень Ф-ERK1/2 после ИП до моделирования летальной ишемии, поэтому не вполне понятна роль названной киназы в механизме прекондиционирования. Исследователи не обнаружили изменения количества белка ERK1/2 после летальной ишемии и реперфузии у контрольных и прекондиционированных животных [37]. Интрацеребровентрикулярная инфузия ингибитора NMDA-рецепторов МК-801 и хелатора ионов кальция EGTA за 20 мин до ИП устраняла подъём Ф-ERK1/2 после 6-минутной окклюзии каротидных артерий. Указанные соединения не только блокировали фосфорилирование ERK1/2, но и устраняли нейропротекторный эффект ИП. Авторы полагают, что триггером ИП является глутамат, который активирует NMDA-рецепторы, что ведет к усилению поступления в клетку  $Ca^{2+}$ , который способствует фосфорилированию ERK1/2: глутамат  $\rightarrow$  NMDA-рецепторы  $\rightarrow Ca^{2+} \rightarrow$  Ф-ERK1/2 [37]. Остаётся неясным, почему от момента включения триггерного механизма до появления Ф-ERK1/2 потребовалось 3-е сут. Эти данные были подтверждены в 2007 г. J. Jia и соавт. В экспериментах *in vitro* на срезах гиппокампа [14]. Прекондиционирование моделировали, удаляя из среды инкубации кислород и глюкозу на 10 мин, а ишемические повреждения индуцировали, удаляя из среды инкубации кислород и глюкозу на 45 мин. Кроме того, нейропротекторный эффект ИП имитировали, добавляя в среду инкубации NMDA. Присутствие в среде инкубации ингибитора MEK1/2 PD-98059 полностью устраняло цитопротекторный эффект как ИП, так NMDA. Поскольку MEK1/2 обеспечивает фосфорилирование ERK1/2 [33], то можно полагать, что цепочка событий выстраивается следующим образом: глутамат  $\rightarrow$  NMDA-рецепторы  $\rightarrow$  MEK1/2  $\rightarrow$  Ф-ERK1/2. Американские исследователи опубликовали результаты своих экспериментов со смешанной культурой нейронов и астроцитов. Прекондиционирование они воспроизводили, удаляя из среды инкубации глюкозу и кислород на 1 ч, а ишемическое повреждение индуцировали, инкубируя клетки в среде без кислорода и глюкозы в течение 4 ч. Ишемическое повреждение моделировали через 48 ч после ИП. Оказалось, что блокада MEK1/2 с помощью PD-98059 устраняет цитопротекторный эффект ИП [16]. Впрочем, по данным исследователей, выполнявших эксперименты на культуре нейронов коры, нейропротекторный эффект ИП сохранялся в условиях применения PD-98059 [35].

Этот факт говорит о том, что MEK1/2 не является единственной киназой, которая участвует в прекондиционировании.

### Белок Ras и NO-синтаза

Ras-ГТФ-связывающий белок, впервые выделенный из саркомы мышей и крыс (**Rat sarcoma**) в 1979 г. [34]. Первая работа об участии Ras в ишемическом прекондиционировании была опубликована в 2000 г. М. и соавт. [13]. Исследования проводили на культуре нейронов коры. Прекондиционирование осуществляли, удаляя из среды инкубации кислород и глюкозу на 5 мин, через 24 ч воспроизводили летальную аноксию, удаляя из среды инкубации  $O_2$  и глюкозу на 60 мин, что приводило к гибели 60% нейронов в контроле (аноксия без ИП) после 24-часовой реоксигенации. Если нейроны были прекондиционированы, то гибель клеток при летальной аноксии выявить не удалось [13]. Фармакологические агенты добавляли в среду инкубации за 15 мин до ИП. Блокада NMDA-рецепторов с помощью антагониста МК-801 или антагониста AP-5 приводила к полному исчезновению цитопротекторного эффекта ИП. Блокада AMPA-рецепторов ( $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол пропионат) с помощью антагониста DNQX обеспечивала ослабление нейропротекторного эффекта ИП, но не устраняла его полностью. Хелатор ионов  $Ca^{2+}$  EGTA устранял цитопротекторный эффект ИП, блокатор  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа нифедипин ослаблял нейропротекторный эффект ИП, но не устранял его полностью. Доноры NO имитировали цитопротекторный эффект прекондиционирования, а ингибитор NO-синтазы (NOS) нитро-L-аргинин устранял защитный эффект ИП. Кроме того, эти авторы обнаружили, что прекондиционирование ведёт к активации Ras. Активация Ras не проявлялась в условиях блокады NMDA-рецепторов или ингибирования NO-синтазы, но сохранялась после блокады гуанилатциклазы ингибитором ODQ [13]. Этот факт говорит о том, что цГМФ не может быть медиатором ИП. Нейропротекторный эффект ИП не проявлялся после добавления в среду инкубации Ras-ингибитора FPT Inh III. Через 10 мин после прекондиционирования авторы зафиксировали увеличение уровня Ф-ERK1 и Ф-ERK2 [13]. Внесение в среду инкубации МК-801 или ингибитора NO-синтазы L-NAME полностью устраняло ИП-индуцированное фосфорилирование ERK1/2. Так же действовал FPT Inh III. Ингибитор MEK1/2 PD 98059 полностью устранял подъём уровня Ф-ERK1/2 после ИП [13]. Кроме того, исследователи получили косвенные данные об участии в ИП Raf-киназы, киназы, которая была впервые охарактеризована в 1983 г. [30], как retrovirus antigen factor (Raf). Известно,

что нейрональная NO-синтаза является  $Ca^{2+}$ -зависимым ферментом [1], поэтому можно предположить, что после ИП развивается следующая цепочка событий: глутамат  $\rightarrow$  NMDA-рецептор и AMPA-рецептор  $\rightarrow$  увеличение  $[Ca^{2+}]_i \rightarrow$  NOS  $\rightarrow$  Ras  $\rightarrow$  Raf  $\rightarrow$  MEK1/2  $\rightarrow$  Ф-ERK1/2. Есть мнение [33], что события в клетке после ИП развиваются следующим образом: цитокины  $\rightarrow$  RTK  $\rightarrow$  Ras  $\rightarrow$  Raf  $\rightarrow$  MEK1/2  $\rightarrow$  Ф-ERK1/2  $\rightarrow$  MSKs  $\rightarrow$  Bad  $\rightarrow$  MPT-пора, где MSKs — mitogen- and stress-activated kinases. Следует отметить, что участие рецепторных тирозинкиназ в ИП пока не доказано. Кроме того, необходимо отметить, что в выше приведенных работах речь идёт о позднем ИП. Неясно, как развиваются события при раннем ИП мозга.

### Протеинкиназа С и циклооксигеназа-2

Общеизвестно, что в ИП сердца важную роль играет протеинкиназа С (ПКС) [3], поэтому исследователи попытались выяснить, какова роль ПКС в ИП мозга. Признаком активации ПКС является транслокация в клеточные мембраны [3]. Первая работа об участии ПКС в ИП была опубликована в 1999 г. [33]. Исследования проводили на культуре нейронов коры мозга. Прекондиционирование моделировали, удаляя из среды инкубации кислород и глюкозу на 90 мин за 24 ч до летальной аноксии, которую воспроизводили с помощью 3-часовой аноксии без глюкозы. Оказалось, что блокада ПКС с помощью хелеритрина или стауроспорина не влияет на цитопротекторный эффект ИП [35]. Этот факт говорит о том, что ПКС не участвует в ИП нейронов. К иному заключению пришли исследователи, которые воспроизводили прекондиционирование у крыс с помощью 2-минутной глобальной ишемии мозга [20]. Через 30 мин и 4 ч после ишемии происходила транслокация в клеточные мембраны изоэнзимов ПКС $\alpha$  и ПКС $\delta$ , а уровень связанной с мембраной ПКС $\epsilon$  и ПКС $\zeta$ , напротив, снижался. К сожалению, авторы не использовали ингибиторы ПКС, поэтому осталось неясным, участвуют или изоформы ПКС в ИП. В 2003 г. были получены данные в пользу участия ПКС $\epsilon$  в прекондиционировании [31]. Эксперименты они проводили *in vitro* на срезах гиппокампа. Прекондиционирование они индуцировали, удаляя из среды инкубации кислород и глюкозу на 15 мин, а летальную аноксию воспроизводили, удаляя эти субстраты на 45 мин. После ИП срезы инкубировали в течение 48 ч при нормальном содержании глюкозы и кислорода. Кроме того, ИП имитировали, добавляя в среду инкубации NMDA на 1 ч за 48 ч до летальной аноксии. Блокада NMDA-рецепторов во время прекондиционирования устраняла нейропротекторный эффект ИП [31]. Прекондиционирование и NMDA

индуцировали транслокацию ПКС $\epsilon$  в клеточные мембраны. Хелатор ионов  $\text{Ca}^{2+}$  EGTA устранял нейропротекторный эффект ИП и NMDA, так же действовал ингибитор ПКС хелеритрин. Активатор всех изоформ ПКС форбол-миристан ацетат не повышал устойчивость клеток к аноксии. Этот факт говорит о том, что роль изоформ ПКС в регуляции толерантности клеток к аноксии может быть прямо противоположной. Так, полагают, что активация ПКС $\epsilon$  способствует повышению резистентности нейронов к гипоксии, а стимуляция ПКС $\delta$  способствует гибели клеток в условиях нехватки кислорода [28]. Вместе с тем, аналог диацилглицерола (ДАГ) олеилацетилглицерол имитировал нейропротекторный эффект ИП. Авторы полагают, что сигнальный механизм ИП представлен следующим образом: ИП  $\rightarrow$  глутамат  $\rightarrow$  NMDA-рецептор  $\rightarrow$   $[\text{Ca}^{2+}]_i$   $\rightarrow$  ФЛС  $\rightarrow$  ДАГ  $\rightarrow$  ПКС $\epsilon$   $\rightarrow$  нейропротекция [31]. Более наглядные данные были получены исследователями из Калифорнии, которые ИП воспроизводили *in vitro* на срезах гиппокампа, удаляя на 15 мин из среды инкубации глюкозу и  $\text{O}_2$ , а летальную аноксию индуцировали, удаляя кислород из среды инкубации на 40 мин, а через 24 ч реперфузии оценивали гибель нейронов [21]. В данном случае речь идёт об отсроченном ИП, поскольку летальную аноксию моделировали через 24 ч после прекоинкубации. Оказалось, что селективная блокада ПКС $\epsilon$  с помощью пептида  $\epsilon\text{V1-2}$  устраняет нейропротекторный эффект ИП [21], также действовал ингибитор фосфолипазы С (ФЛС) U-73122. Селективный пептидный ПКС $\epsilon$ -активатор  $\psi\epsilon\text{RACK}$  имитировал цитопротекторный эффект ИП. Блокада аденозиновых  $\text{A}_1$  рецепторов приводила к исчезновению цитопротекторного эффекта ИП. Цитопротекторный эффект ИП имитировал агонист  $\text{A}_1$  рецепторов. Ингибитор MEK1/2 PD-98059 устранял защитный эффект ИП [21]. Эти факты говорят о том, что в отсроченном ИП участвует следующая цепочка событий: ИП  $\rightarrow$  аденозин  $\rightarrow$   $\text{A}_1$  рецептор  $\rightarrow$  ФЛС  $\rightarrow$  ДАГ  $\rightarrow$  ПКС $\epsilon$   $\rightarrow$  MEK1/2  $\rightarrow$  ERK1/2  $\rightarrow$  повышение толерантности к ишемии-реперфузии [28]. Некоторые авторы полагают [28], что события могут развиваться и по другому сценарию: ИП  $\rightarrow$  глутамат  $\rightarrow$  NMDA-рецептор  $\rightarrow$   $[\text{Ca}^{2+}]_i$   $\rightarrow$  ФЛС  $\rightarrow$  ДАГ  $\rightarrow$  ПКС $\epsilon$   $\rightarrow$  MEK1/2  $\rightarrow$  ERK1/2  $\rightarrow$  нейропротекция или ИП  $\rightarrow$  глутамат  $\rightarrow$  NMDA-рецептор  $\rightarrow$   $[\text{Ca}^{2+}]_i$   $\rightarrow$  митохондрии  $\rightarrow$  АФК  $\rightarrow$  ПКС $\epsilon$   $\rightarrow$  MEK1/2  $\rightarrow$  ERK1/2  $\rightarrow$  нейропротекция, где АФК — активные формы кислорода. Важная роль ПКС в ИП была подтверждена в работе китайских физиологов [14], которые проводили эксперименты на срезах гиппокампа. Прекоинкубация моделировали, удаляя из среды инкуба-

ции кислород и глюкозу, а после 30 мин реоксигенации воспроизводили летальное повреждение, удаляя кислород и глюкозу на 45 мин. Следовательно, в данном случае речь идёт о раннем ИП. Прекоинкубирование имитировали, добавляя в среду инкубации на 30 мин NMDA, с последующей «отмывкой» клеток за 30 мин до летальной аноксии [14]. Прекоинкубирование и NMDA индуцировали транслокацию ПКС $\epsilon$  в мембраны клеток. Селективный ингибитор названной киназы  $\epsilon\text{V1-2}$  и селективный MEK1/2-ингибитор PD-98059 устраняли нейропротекторный эффект ИП и NMDA. Антагонист NMDA-рецепторов MK-801 блокировал ИП-индуцированную транслокацию ПКС $\epsilon$  [14]. Следовательно, события развиваются в следующем порядке: ИП  $\rightarrow$  глутамат  $\rightarrow$  NMDA-рецептор  $\rightarrow$  ПКС $\epsilon$   $\rightarrow$  MEK1/2  $\rightarrow$  ERK1/2  $\rightarrow$  нейропротекция, что согласуется с выше приведенными данными. Участие ПКС $\epsilon$  в отсроченном ИП подтвердили физиологи из Майами [16], которые эксперименты *in vitro* проводили на культуре нейронов и астроцитов, а также на срезах гиппокампа. Прекоинкубирование индуцировали, удаляя из среды инкубации кислород и глюкозу на 1 ч в опытах с клетками и на 15 мин в экспериментах со срезами. Через 48 ч воспроизводили летальную аноксию. Прекоинкубирование обеспечивало усиление экспрессии СОХ-2 (cyclooxygenase-2), которое достигало максимума через 24 ч после ИП. Ингибитор СОХ-2 NS-398 устранял цитопротекторный эффект ИП на обеих *in vitro* моделях. Селективные ингибиторы ПКС $\epsilon$  или MEK1/2 устраняли нейропротекторный эффект ИП. Активатор ПКС $\epsilon$   $\psi\epsilon\text{RACK}$  имитировал защитный эффект ИП как *in vitro* [16], так и *in vivo* [11]. Эти данные были подтверждены в более поздней работе того же авторского коллектива из Майами [17]. Они обнаружили, что ИП ведёт к транслокации в ядро клетки р65- и р53-субъединиц транскрипционного фактора NF $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B). Ингибитор NF $\kappa$ B дитиокарбамат устранял нейропротекцию, индуцированную ИП или  $\psi\epsilon\text{RACK}$ . Ингибирование NF $\kappa$ B устраняло ИП-индуцированное усиление экспрессии СОХ-2. Блокада ПКС $\epsilon$  или ингибирование MEK1/2 предупреждали появление в ядре клетки р65 и р53 субъединиц. Авторы полагают [17], что ИП «включает» следующий сигнальный механизм: ИП  $\rightarrow$  ПКС $\epsilon$   $\rightarrow$  MEK1/2  $\rightarrow$  ERK1/2  $\rightarrow$  NF $\kappa$ B  $\rightarrow$  СОХ-2  $\rightarrow$  нейропротекция.

Одним из наиболее интригующих вопросов, связанных с ИП, является вопрос о природе конечного эффектора ИП. Мы предполагаем, что конечным эффектором прекоинкубирования может быть АТФ-чувствительный  $\text{K}^+$ -канал ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ -канал) [2],

поэтому работа авторов, которые попытались оценить взаимодействие ПКС $\epsilon$  и  $K_{ATP}$ -каналов в механизме прекондиционирования, показала нам особо интересной [32]. Для индукции ИП срезы гиппокампа подвергали воздействию 15-минутной аноксии без глюкозы, а через 48 воспроизводили летальную аноксию, удаляя из среды инкубации кислород и глюкозу на 40 мин. В группе контроля были срезы, которые подвергали действию летальной аноксии без прекондиционирования. Блокада митохондриальных  $K_{ATP}$ -каналов (мит $K_{ATP}$ -каналов) с помощью 5-гидроксидеканоата устраняла цитопротекторный эффект ИП. Так же действовал селективный ПКС $\epsilon$ -ингибитор  $\epsilon V1-2$ . Активатор ПКС $\epsilon$   $\psi ERACK$  повышал толерантность клеток к аноксии, такой же эффект оказывал «открыватель» мит $K_{ATP}$ -каналов диазоксид. Блокада мит $K_{ATP}$ -каналов устраняла нейропротекторный эффект  $\psi ERACK$ . Прекондиционирование и  $\psi ERACK$  вызывали фосфорилирование Kir6.2-субъединицы  $K_{ATP}$ -каналов в митохондриях. ПКС $\epsilon$ -ингибитор  $\epsilon V1-2$  устранял ИП-индуцированное фосфорилирование Kir6.2. Эти авторы полагают, что мит $K_{ATP}$ -каналы являются мишенью для ПКС $\epsilon$ , а события в клетке развиваются следующим образом: ИП  $\rightarrow$  ПКС $\epsilon$   $\rightarrow$  мит $K_{ATP}$ -канал  $\rightarrow$  нейропротекция [32]. Важную роль митохондрий в качестве мишени для ПКС $\epsilon$  во время прекондиционирования подтверждают и другие авторы [10]. Прекондиционирование они индуцировали с помощью 2-минутной окклюзии сонных артерий на фоне гипотензии. Через 48 ч после ИП выделяли синапсомы и проводили исследования. Оказалось, что ИП обеспечивает увеличение белка и мРНК ПКС $\epsilon$ . Применение ПКС $\epsilon$ -активатора  $\psi ERACK$  обеспечивало усиление дыхания синапсомальных митохондрий и индуцировало фосфорилирование белков дыхательной цепи. Эти эффекты были зафиксированы только в экспериментах с синапсомы, выделенными из мозга прекондиционированных особей. Авторы заключили, что фосфорилирование дыхательной цепи ПКС $\epsilon$  может иметь прямое отношение к нейропротекторному эффекту ИП [10].

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что ПКС $\epsilon$  и COX-2 играют важную роль в ИП мозга, а мит $K_{ATP}$ -канал может быть конечным фактором отсроченного прекондиционирования.

### Киназа CaMK

Киназа CaMK — Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase. Как известно, ишемия ведёт к увеличению концентрации внутриклеточного кальция [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, который играет роль внутриклеточного мес-

сенджера [39]. В частности Ca<sup>2+</sup> активирует CaMK [39]. В 2000 г. T.J. Blanck и соавт. [8] обнаружили, что изофлуран имитирует феномен ИП. Нейропротекторный эффект изофлурана зависел от активации CaMKII [8]. В 2003 г. канадские физиологи [36] получили данные в пользу участия CaMK в ИП. Эксперименты они проводили на культуре кортикальных нейронов крысы. Прекондиционирование индуцировали, удаляя из среды инкубации кислород и глюкозу на 60 мин, через 24 ч индуцировали летальную аноксию, удаляя глюкозу и O<sub>2</sub> на 90 мин. Кроме того, через 24 ч оценивали нейротоксический эффект NMDA. Исследователи показали [36], что нейропротекторный эффект ИП не проявляется в условиях селективной блокады CaMKII с помощью ингибитора KN-62. Китайские исследователи [23] ИП моделировали с помощью 3-минутной глобальной ишемии мозга. Через 3 дня воспроизводили 6-минутную ишемию мозга, которая вызывала гибель CA1-нейронов гиппокампа. Оказалось, что цитопротекторный ИП не проявлялся, если крысам интрацеребровентрикулярно вводили KN-62. Следовательно, можно утверждать, что CaMKII играет важную роль в отсроченном ИП. Полагают [../sites/entrez39], что после ИП формируется следующий сигнальный каскад: ИП  $\rightarrow$  глутамат  $\rightarrow$  NMDA-рецептор  $\rightarrow$  увеличение [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>  $\rightarrow$  CaMKII  $\rightarrow$  Akt  $\rightarrow$  Bad  $\rightarrow$  нейропротекция.

### Заключение

Анализ опубликованных данных свидетельствует о том, что в сигнальном механизме отсроченного ишемического прекондиционирования важную роль играют белок Ras и следующие киназы: PI3K, Akt, MEK1/2, ERK1/2, ПКС, CaMKII. Кроме того, в позднем прекондиционировании принимают участие циклооксигеназа-2, NO-синтаза, мит $K_{ATP}$ -канал. Сигнальный механизм раннего ишемического прекондиционирования остаётся неизученным.

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

### Список литературы

1. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. — М.: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001. — 343 с.
2. Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н., Круг Т., Халиулин И.Г. Проблема конечного эффектора позднего ишемического прекондиционирования сердца // Росс. Физиол. Журн. — 2010. — Т. 96, №4. — С. 337-352.

3. **Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Соленкова Н.В.** Адаптация миокарда к ишемии. Первая фаза ишемического preconditionирования // Успехи физиол. наук. — 2006. — Т. 37, №3. — С. 25-41.
4. **Маслов Л.Н.** Роль эритропоэтина в ишемическом preconditionировании, постconditionировании и регенерации мозга после ишемии // Росс. Физиол. Жур. — 2010. — Т. 96, №1. — С. 26-41.
5. **Саватеев А.В., Саватеева-Любимова Т.Н.** Апоптоз — универсальный механизм гибели и выживания при ишемии и реперфузии. Пути фармакологического контроля // Экспер. Клин. Фармакол. — 2010. — Т. 73, №12. — С. 44-49.
6. **Atochin D.N., Clark J., Demchenko I.T.** et al. Rapid cerebral ischemic preconditioning in mice deficient in endothelial and neuronal nitric oxide synthases // Stroke. — 2003. — Vol. 34, №5. — P. 1299-1303.
7. **Barone F.C., White R.F., Spera P.A.** et al. Ischemic preconditioning and brain tolerance: temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression // Stroke. — 1998. — Vol. 29, №9. — P. 1937-1950.
8. **Blanck T.J., Haile M., Xu F.** et al. Isoflurane pretreatment ameliorates posts ischemic neurologic dysfunction and preserves hippocampal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in a canine cardiac arrest model // Anesthesiology. — 2000. — Vol. 93, №5. — P. 1285-1293.
9. **Choi J.S., Kim H.Y., Cha J.H., Lee M.Y.** Ischemic preconditioning-induced activation of ERK1/2 in the rat hippocampus // Neurosci. Lett. — 2006. — Vol. 409, №3. — P. 187-191.
10. **Dave K.R., DeFazio R.A., Raval A.P.** et al. Ischemic preconditioning targets the respiration of synaptic mitochondria via protein kinase C $\epsilon$  // J. Neurosci. — 2008. — Vol. 28, №16. — P. 4172-4182.
11. **Della-Morte D., Raval A.P., Dave K.R.** et al. Post-ischemic activation of protein kinase C epsilon protects the hippocampus from cerebral ischemic injury via alterations in cerebral blood flow // Neurosci. Lett. — 2011. — Vol. 487, №2. — P. 158-162.
12. **Garcia L., Burda J., Hrehorovska M.** et al. Ischaemic preconditioning in the rat brain: effect on the activity of several initiation factors, Akt and extracellular signal-regulated protein kinase phosphorylation, and GRP78 and GADD34 expression // J. Neurochem. — 2004. — Vol. 88, №1. — P. 136-147.
13. **Gonzalez-Zulueta M., Feldman A.B., Klesse L.J.** et al. Requirement for nitric oxide activation of p21(ras)/extracellular regulated kinase in neuronal ischemic preconditioning // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2000. — Vol. 97, №1. — P. 436-441.
14. **Jia J., Wang X., Li H.** et al. Activations of nPKC $\epsilon$  and ERK1/2 were involved in oxygen-glucose deprivation-induced neuroprotection via NMDA receptors in hippocampal slices of mice // J. Neurosurg. Anesthesiol. — 2007. — Vol. 19, №1. — P. 18-24.
15. **Kato H., Liu Y., Araki T., Kogure K.** MK-801, but not anisomycin, inhibits the induction of tolerance to ischemia in the gerbil hippocampus // Neurosci. Lett. — 1992. — Vol. 139, №1. — P. 118-121.
16. **Kim E., Raval A.P., Defazio R.A., Perez-Pinzon M.A.** Ischemic preconditioning via epsilon protein kinase C activation requires cyclooxygenase-2 activation *in vitro* // Neuroscience. — 2007. — Vol. 145, №3. — P. 931-941.
17. **Kim E.J., Raval A.P., Hirsch N., Perez-Pinzon M.A.** Ischemic preconditioning mediates cyclooxygenase-2 expression via nuclear factor-kappa B activation in mixed cortical neuronal cultures // Transl. Stroke Res. — 2010. — Vol. 1, №1. — P. 40-47.
18. **Kitagawa K., Matsumoto M., Tagaya M.** et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain // Brain Res. — 1990. — Vol. 528, №1. — P. 21-24.
19. **Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C.** Mitochondrial membrane permeabilization in cell death // Physiol. Rev. — 2007. — Vol. 87, №1. — P. 99-163.
20. **Kurkinen K., Busto R., Goldsteins G.** et al. Isoform-specific membrane translocation of protein kinase C after ischemic preconditioning // Neurochem. Res. — 2001. — Vol. 26, №10. — P. 1139-1144.
21. **Lange-Asschenfeldt C., Raval A.P., Dave K.R.** et al. Epsilon protein kinase C mediated ischemic tolerance requires activation of the extracellular regulated kinase pathway in the organotypic hippocampal slice // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 2004. — Vol. 24, №6. — P. 636-645.
22. **Liu H.Q., Li W.B., Li Q.J.** et al. Nitric oxide participates in the induction of brain ischemic tolerance via activating ERK1/2 signaling pathways // Neurochem. Res. — 2006. — Vol. 31, №7. — P. 967-974.
23. **Miao B., Yin X.H., Pei D.S.** et al. Neuroprotective effects of preconditioning ischemia on ischemic brain injury through down-regulating activation of JNK1/2 via N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Akt1 activation // J. Biol. Chem. — 2005. — Vol. 280, №23. — P. 21693-21699.
24. **Mori T., Muramatsu H., Matsui T.** et al. Possible role of the superoxide anion in the development of neuronal tolerance following ischaemic preconditioning in rats // Neuro-pathol. Appl. Neurobiol. — 2000. — Vol. 26, №1. — P. 31-40.
25. **Namura S., Nagata I., Kikuchi H.** et al. Serine-threonine protein kinase Akt does not mediate ischemic tolerance after global ischemia in the gerbil // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 2000. — Vol. 20, №9. — P. 1301-1305.
26. **Nakamura M., Nakakimura K., Matsumoto M., Sakabe T.** Rapid tolerance to focal cerebral ischemia in rats is attenuated by adenosine A<sub>1</sub> receptor antagonist // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 2002. — Vol. 22, №2. — P. 161-170.
27. **Nakajima T., Iwabuchi S., Miyazaki H.** et al. Preconditioning prevents ischemia-induced neuronal death through persistent Akt activation in the penumbra region of the rat brain // J. Vet. Med. Sci. — 2004. — Vol. 66, №5. — P. 521-527.
28. **Perez-Pinzon M.A., Xu G.P., Dietrich W.D.** et al. Rapid preconditioning protects rats against ischemic neuronal damage after 3 but not 7 days of reperfusion following global cerebral ischemia // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 1997. — Vol. 17, №2. — P. 175-182.
29. **Perez-Pinzon M.A., Dave K.R., Raval A.P.** Role of reactive oxygen species and protein kinase C in ischemic tolerance in the brain // Antioxid. Redox Signal. — 2005. — Vol. 7, №9-10. — P. 1150-1157.
30. **Rapp U.R., Goldsborough M.D., Mark G.E.** et al. Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1983. — Vol. 80, №14. — P. 4218-4222.
31. **Raval A.P., Dave K.R., Mochly-Rosen D.** et al.  $\epsilon$ PKC is required for the induction of tolerance by ischemic and NMDA-mediated preconditioning in the organotypic hippocampal slice // J. Neurosci. — 2003. — Vol. 23, №2. — P. 384-391.
32. **Raval A.P., Dave K.R., DeFazio R.A., Perez-Pinzon M.A.**  $\epsilon$ PKC phosphorylates the mitochondrial K<sup>+</sup>ATP channel during induction of ischemic preconditioning in the rat hippocampus // Brain Res. — 2007. — Vol. 1184. — P. 345-353.

33. **Sawe N., Steinberg G., Zhao H.** Dual roles of the MAPK/ERK1/2 cell signaling pathway after stroke // *J. Neurosci. Res.* — 2008. — Vol. 86, №8. — P. 1659-1669.
34. **Shih T.Y., Weeks M.O., Young H.A., Scolnick E.M.** p21 of Kirsten murine sarcoma virus is thermolabile in a viral mutant temperature sensitive for the maintenance of transformation // *J. Virol.* — 1979. — Vol. 31, №2. — P. 546-546.
35. **Tauskela J.S., Chakravarthy B.R., Murray C.L.** et al. Evidence from cultured rat cortical neurons of differences in the mechanism of ischemic preconditioning of brain and heart // *Brain Res.* — 1999. — Vol. 827, №1-2. — P. 143-151.
36. **Tauskela J.S., Brunette E., Monette R.** et al. Preconditioning of cortical neurons by oxygen-glucose deprivation: tolerance induction through abbreviated neurotoxic signaling // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* — 2003. — Vol. 285, №4. — P. C899-C911.
37. **Wang R.M., Yang F., Zhang Y.X.** Preconditioning-induced activation of ERK5 is dependent on moderate  $Ca^{2+}$  influx via NMDA receptors and contributes to ischemic tolerance in the hippocampal CA1 region of rats // *Life Sci.* — 2006. — Vol. 79, №19. — P. 1839-1846.
38. **Yano S., Morioka M., Fukunaga K.** et al. Activation of Akt/protein kinase B contributes to induction of ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2001. — Vol. 21, №4. — P. 351-360.
39. **Yano S., Morioka M., Kuratsu J., Fukunaga K.** Functional proteins involved in regulation of intracellular  $Ca^{2+}$  for drug development: role of calcium/calmodulin-dependent protein kinases in ischemic neuronal death // *J. Pharmacol. Sci.* — 2005. — Vol. 97, №3. — P. 351-354.
40. **Yin X.H., Zhang Q.G., Miao B., Zhang G.Y.** Neuroprotective effects of preconditioning ischaemia on ischaemic brain injury through inhibition of mixed-lineage kinase 3 via NMDA receptor-mediated Akt1 activation // *J. Neurochem.* 2005. — Vol. 93, №4. — P. 1021-1029.
41. **Zhang J., Qian H., Zhao P.** et al. Rapid hypoxia preconditioning protects cortical neurons from glutamate toxicity through  $\delta$ -opioid receptor // *Stroke.* — 2006. — Vol. 37, №4. — P. 1094-1099.
42. **Zhang Q.G., Han D., Xu J.** et al. Zhang G.Y. Ischemic preconditioning negatively regulates plenty of SH3s-mixed lineage kinase 3-Rac1 complex and c-Jun N-terminal kinase 3 signaling via activation of Akt // *Neuroscience.* — 2006. — Vol. 143, №2. — P. 431-444.
43. **Zhao H., Sapolsky R.M., Steinberg G.K.** Phosphoinositide-3-kinase/akt survival signal pathways are implicated in neuronal survival after stroke // *Mol. Neurobiol.* — 2006. — Vol. 34, №3. — P. 249-270.

Поступила 03.03.11



Г.В. Сорокин<sup>2</sup>, В.Н. Боровков<sup>2</sup>, А.В. Еремин<sup>2</sup>, А.А. Орлов<sup>1</sup>, И.Н. Сабурин<sup>1</sup>

## **Стимуляция репаративной регенерации при лечении переломов конечностей с применением новых биотехнологий**

<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 учреждение здравоохранения г.Москвы «Городская клиническая больница №71 Департамента здравоохранения г.Москвы», 121374, Москва, Можайское ш., 14

*В обзоре представлены результаты исследования российских и зарубежных авторов по современным методам стимуляции репаративной регенерации костной ткани. Освещены общие принципы подхода к изготовлению и использованию биопластических материалов. Предпринята попытка классификации наиболее известных биоматериалов в зависимости от их физико-химических и биологических свойств, а также намечены тенденции дальнейшего развития тканевой инженерии, и ее значение в травматологии и ортопедии.*

**Ключевые слова:** костная ткань, репаративная регенерация, биоматериалы, стволовые клетки, гидроксиапатит, гликозоаминогликаны, имплантаты

G.V. Sorokin<sup>2</sup>, V.N. Borovkov<sup>2</sup>, A.V. Eremin<sup>2</sup>, A.A. Orlov<sup>1</sup>, I.N. Saburina<sup>1</sup>

## **The stimulation of reparative regeneration in the treatment of fractures of the extremities with the use of new biotechnologies**

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

<sup>2</sup> City Clinical Hospital №71, 14, Mozhaikoye hwy., Moscow, 121374, Russia

*The paper presents the results of a study of Russian and foreign authors on modern methods of stimulation of reparative regeneration of bone tissue. Highlight general principles for the construction and use of bioplastic materials. An attempt to classify the most famous of biomaterials based on their physico-chemical and biological properties, as well as identified trends in the further development of tissue engineering and its importance in traumatology and orthopedics.*

**Key words:** bone tissue, reparative regeneration, biomaterials, stem cells, hydroxyapatite, glycosaminoglycans, implants

Вопросы клиники, диагностики и лечения повреждений опорно-двигательного аппарата являются актуальными проблемами современной травматологии. Это в первую очередь связано с общим «старением» населения в связи с увеличением продолжительности жизни, перенаселением мегаполисов, воздействием высокоэнергетического травмирующего агента (автотравма, производственная травма и пр.), изменением экологии, режима и качества питания. Среди пострадавших особую группу составляют больные пожилого и старческого возраста с тяжелой сопутствующей патологией. Лечение этих пациентов является одной из важнейших медицинских и социально-экономических проблем в настоящее время. В последние годы отмечается рост числа пострадавших, с сопутствующим остеопорозом различной степени тяжести, сахарным диабетом, аутоиммунными заболеваниями. Это, в

свою очередь, приводит к возникновению многооскольчатых переломов, увеличению сроков их консолидации, создает существенную проблему оперирующему хирургу в выборе наиболее эффективного метода лечения.

Выбор наиболее адекватного метода остеосинтеза является определяющим для исхода лечения и восстановления функции поврежденной конечности. Даже применение накостного и интрамедуллярного остеосинтеза не всегда дают хорошие результаты при лечении переломов, что объясняется излишней травматизацией окружающих мягких тканей, дополнительным нарушением кровообращения в зоне перелома и повышенным риском тромбоэмболических осложнений.

К проблеме репаративной регенерации костной ткани постоянно приковано внимание ученых. Стадии регенерации при переломах, а также морфологическая и биохимическая картина у таких больных изучалась многими исследователями [3, 4, 5, 13]. К факторам, влияющим на состояние остеорепаляции, относятся особенности васкуляризации, иннервации костных от-

**Для корреспонденции:** Сорокин Григорий Валентинович, канд. мед. наук, ординатор ГБУЗ «ГКБ №71 ДЗМ», старш. науч. сотр. лаб. трансляционной медицины ФГБУ НИИОПП РАМН. E-mail: GSorokin72@rambler.ru

ломков в зоне повреждения, нарушения метаболизма и многие другие [4]. Нарушение процессов регенерации приводят к замедлению консолидации или несращению фрагментов при переломах длинных костей в 3—35% случаев [13]. Поэтому детальное изучение причин, приводящих к нарушению метаболизма в костной ткани и в организме в целом, имеет огромное значение. А разработка методов стимуляции остеопарации при расстройствах костной регенерации всегда остается актуальной [2].

В настоящее время в мире существует большое количество разнообразных биопластических материалов синтетического, полусинтетического или лишенного видоспецифических свойств биологического происхождения, предназначенных для введения в живой организм с целью постоянного или временно-го замещения дефектов тканей или пораженных структур.

К наиболее известным в заместительной хирургии относятся коллагены, гидроксипатиты, биокерамика, декальцинированный костный матрикс и т.д.

Применение биотрансплантатов наиболее целесообразно:

- 1) у больных с изолированными многооскольчатыми переломами длинных трубчатых костей с относительными и абсолютными дефектами кости;
- 2) у больных с множественными переломами длинных трубчатых костей;
- 3) у больных с сочетанной травмой, включая переломы длинных трубчатых костей.

Биотрансплантат применяется в сочетании со стандартными методами лечения переломов, дополняя их. По данным литературы, применение биотрансплантата в большинстве случаев способствует сокращению сроков сращения кости на 30—50%.

Дальнейшего исследования требует изучение механизмов репаративного костеобразования и определения наиболее эффективных способов стимуляции восстановительных процессов при нарушении целостности костной ткани.

Решением именно этих вопросов занимается одна из современных отраслей биологии и медицины — тканевая инженерия, основные задачи которой заключаются в разработке новых биоконпозиционных материалов, трансплантации на таких носителях клеток в различные ткани и органы, повышении репаративных процессов в них и создании «искусственных» органов и органо-тканевых композиций [22].

По мере накопления опыта, связанного с биоимплантологией, процесс создания новых материалов становится все более трудоемким и высокотехнологичным, который сопровождается обязательным соблюдением клинической безопасности и наличием доказуемой эффективности «конечного продукта».

В современной имплантологии можно выделить несколько уровней технологических разработок в изготовлении биопластических материалов, в данном случае костных алло- и ксеноимплантатов.

**На I уровне** не предусматривается глубокая переработка донорских тканей. На этом уровне ткани или забираются в асептических условиях и консервируются низкими температурами, либо очищаются, обезжириваются и обрабатываются химическими реагентами, достигая тем самым одновременной консервации и стерилизации [20].

**На II уровне** ткани подвергаются более серьезной обработке, которая заключается в изменении соотношения минерального и органического компонентов. В таких случаях материал приобретает наряду с остеокондуктивными и дополнительные остеоиндуктивные свойства [6].

**III уровень** предполагает создание биоконпозиционных материалов, содержащих компоненты костной ткани, заселенные биоактивными субстанциями. К последним относятся факторы роста, морфогенетические белки и другие компоненты костного матрикса. Биоактивным субстанциям отводят роль активаторов и регуляторов физиологической регенерации тканей. Кроме того, на стадии имплантации в состав таких материалов могут быть включены и трансплантируемые различные клетки-предшественники [14].

За последние 10 лет были разработаны и внедрены в медицинскую практику ряд новых биопластических материалов второго и третьего технологических уровней.

Прежде всего, это созданный в тканевом банке ЦИТО, «Перфоост», представляющий собой лиофилизированные деминерализованные костные аллоимплантаты (ДКИ), выполненные в виде пластин, стружки, чипсов и т.д. Разная степень деминерализации и геометрия данных биопластических материалов позволили использовать его во многих областях реконструктивной хирургии, как для заполнения любых костных дефектов, так и для ускорения процессов остеогенеза [7, 12]. Для практической медицины банком ЦИТО были также предложены ДКИ, изготовленные из костей свода черепа. Благодаря их большой площади и высокой степени деминерализации этот материал в настоящее время широко используется в ортопедии при проведении ревизионного эндопротезирования для замещения значительных дефектов дна и стенок вертлужной впадины тазобедренного сустава. Более того, они нашли широкое применение в нейрохирургии, офтальмологии, челюстно-лицевой хирургии, стоматологии и т.д. [1].

Базируясь на принципах тканевой инженерии и результатах собственных научных исследований, фирма ООО «КОНЕКТБИОФАРМ» разработала биоконпозиционные материалы для хирургической стоматологии, травматологии и ортопедии.

Они представляют собой новое поколение остеопластических материалов, полученных с помощью оригинальных технологий из высокоочищенного костного коллагена, костных сульфатированные гликозаминогликаны (сГАГ) и костного минерального компонента — гидроксиапатита (ГА).

Особый интерес представляют препараты, содержащие костные сульфатированные гликозаминогликаны (биоматрикс, биоимплант, алломатрикс-имплант, остеоматрикс).

«Биоимплант» — гранулированный остеоиндуктивный и остеокондуктивный материал на основе склерального ксеноколлагена, костного ксено-ГА и костных ксено-сГАГ.

«Биоматрикс» — остеоиндуктивный и остеокондуктивный материал на основе костного ксеноколлагена и костных ксено-сГАГ.

«Алломатрикс-имплант» — остеоиндуктивный материал на основе аллоколлагена и костных алло-сГАГ (разработан совместно с ГУН ЦИТО им. Н.Н. Приорова).

«Остеоматрикс» — один из наиболее эффективных отечественных пластических материалов в травматологии и ортопедии нового поколения. Разработан фирмой ООО «Конектбиофарм» совместно с тканевым банком ГУН ЦИТО им. Н.Н. Приорова. Основное различие между этими материалами состоит в том, что «Алломатрикс-имплант» содержит костный коллаген и костные сГАГ, а «Остеоматрикс», имея в своем составе те же два основных компонента костной ткани, содержит ещё и ГА в природной форме. За счет сохранной архитектоники ГА и коллагена, наличие биологической активности сГАГ материал обладает выраженными механическими и остеоиндуктивными свойствами. Они выпускаются в форме блоков и гранул.

Для вышеуказанных материалов аналогов нет, хотя для сравнения можно привести такие материалы, как Allograft фирмы SeraMed, USA (деминерализованная кость человека в виде частиц различного размера), AlloGro компании AlloSource, USA (деминерализованная кость человека в виде костной «крошки» с доказанной остеоиндуктивной активностью) и CapSet фирмы LifeCore, USA (деминерализованная кость человека в композиции с сульфатом кальция).

Существенными отличиями этих материалов является то, что все они не сохраняют структурно-тканевую организацию кости, содержат множество антигенных факторов и сГАГ в них слабо доступны для клеток.

Таким образом, фирмой ООО «КОНЕКТБИОФАРМ» на настоящий момент разработаны современные технологии получения основных компонентов соединительной ткани, что способствует дальнейшему развитию нового направления в медицине и биологии тканевой инженерии.

Другую важнейшую группу биологически активных костных имплантатов составляет гидроксиапатит и содержащие его препараты. Известно, что прочность кости связана с наличием в её составе ГА. Однако при изготовлении многих пластических материалов из костной ткани ГА обычно удаляют. Это делается для того, чтобы после имплантации органический матрикс кости был максимально доступен для процессов ремоделирования и формирования костной ткани реципиента. С другой стороны, если готовят материалы из природного ГА то они, как правило, достаточно хрупки и их прочностные характеристики значительно уступают нативной кости. Следовательно, прочность костной ткани зависит в первую очередь от структурного взаимодействия коллагена и ГА [10].

Так, ЗАО «Полистом» реализует гидроксиапол и его композиции с коллагеном, в частности колапол КП-3. Аналогичные материалы в виде гранул, пластик и геля выпускает фирма «Интермедапатит».

Большинство используемых остеопластических материалов для оптимизации остеогенеза, наряду с хорошей эффективностью применения, имеют большое количество недостатков.

Можно перечислить основные качества, которыми должен обладать идеальный остеопластический материал:

- 1) хорошая переносимость тканями и отсутствие нежелательных реакций;
- 2) пористость, что обеспечивает возможность миграции сосудов и клеток, способствующих образованию и формированию *de novo* образованной ткани;
- 3) биодegradация, что предотвращает потерю механической прочности или инфицирования материала после образования костной ткани;
- 4) возможность стерилизации без изменения качеств;
- 5) доступность и низкая цена.

Для ускорения процессов остеоинтеграции в последние годы стали использовать остеопластический материал, заселенный мезенхимальными стволовыми клетками (МСК). Проведение исследований по использованию стволовых мезенхимальных клеток при лечении заболеваний и травм опорно-двигательного аппарата затруднено жесткими правовыми рамками. Эксперименты *IN VITRO* по использованию мезенхимальных стволовых клеток показали, что они обладают большим потенциалом для лечения дефектов тканей. Последние данные убедительно доказывают, что МСК могут с успехом применяться в оперативной ортопедии и травматологии, особенно для лечения костных дефектов. К сожалению, по-прежнему существует огромный разрыв между множеством данных исследований на животных и клиническими испытаниями.

Открытое моноцентрированное контролируемое исследование проводилось и в ФГУ «Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена Росздрава» совместно с Санкт-Петербургским Государственным Медицинским Университетом им. академика И.П. Павлова и ООО «Транс-Технологии», Санкт-Петербург, Россия. В данном исследовании для замещения ограниченных костных дефектов применялась костная пластика деминерализованными костными трансплантатами, заселенными аутологичными мезенхимными стволовыми клетками (МСК). Исследование утверждено Ученым советом и разрешено Этическим комитетом РНИИТО им. Р.Р. Вредена. Таким образом, данный метод перспективен для дальнейшего изучения и клинического использования.

В последнее время активно разрабатывается и **IV технологический уровень**, характеризующийся созданием синтетических биокomпозиционных материалов на базе современных технологий. К последним относятся стерилизационное копирование тканей [16], технологии создания 3-мерных имплантатов [15, 18], жидкостно-распределительное моделирование [21] и фазовоизменяющее создание имплантатов [19]. Соединение этих методов позволяет с высокой точностью копировать тканевые объекты и создавать материалы с четко определенными размерами, геометрией и распределением пор, а так же полностью воспроизводить архитектуру органного участка и его внутренних каналов в создаваемом имплантате.

Наша научная работа проводится с **IV** технологическим уровнем, который основывается на синтетическом биокomпозиционном материале на основе аутологичных МСК в виде сфероидов, изготавливаемых по системе CAD-CAM; созданием из него биокomпозиций на основе сфероидов с протеканием в них процессов остеогенеза и ангиогенеза и выходом на **V** технологический уровень создания кости по гено- и фенотипу. Целью является создание объекта для устранения дефекта и деформации кости в виде 3D композиции по системе CAD-CAM и заселением её аутологичными МСК в виде сфероидов, что дает возможность называть этот биологический материал по гено- и фенотипическому признаку собственной костью, соответствующего больного.

Для реализации поставленной цели необходимо изучить формирование остеопластического процесса регенерации кости, поэтому необходимо создать биологическую модель по генотипическому и фенотипическому типу больного, устраняющей дефект и деформацию кости по её антропометрическим данным; создать искусственную кость, приближающуюся по своим характеристикам к «золотому стандарту» собственной кости из нерезорбирующегося остеопластического материала, заселенного аутологичными МСК; определить критерии

выбора материала для создания 3D композиций и заселения аутологичных МСК; определение типа аутологичных клеток для заселения на носитель.

Насыщенный материал стволовыми клетками или группами клеток (сфероидами), как показали эксперименты *IN VITRO*, формируют собственную систему микроциркуляторного русла. А наличие аутоиммунных МСК самого пациента в искусственном материале говорит о том, что по данной кости по генетическому и фенотипическому типу принадлежит этому пациенту. Такие структурные пластические процессы начинаются с 5—7 суток, а процессы остеоинтеграции начинаются практически с момента фиксации сфероидов на поверхности остеопластического материала [8].

В НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН проведено доклиническое исследование эффективности и безопасности остеопластического материала *chronOST<sup>TM</sup>*, в ходе которого выявлены существенные преимущества этого материала перед другими остеопластическими материалами, используемыми в настоящее время в стоматологии.

Остеопластический материал с торговой маркой *chronOST<sup>TM</sup>* появился в 1999 г. Основой материала является  $\beta$ -Трикальций фосфат, который имеет пористую структуру и представляет собой систему сообщающихся ячеек. В ячейки активно мигрируют сосуды, клетки окружающих тканей. В ячейках формируется *de novo* образованная костная ткань, а кальциевый матрикс резорбируется за счет деятельности гигантских многоядерных клеток.

В качестве тест-системы были использованы крысы CD в возрасте 16 недель, полученные из НПП «Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН». Для создания модели остеоинтеграции на теле и ветви нижней челюсти крысы с применением остеопластического материала *chronOST<sup>TM</sup>* ( $\beta$ -Трикальций фосфат) с фиксацией блоков *chronOST<sup>TM</sup>* стальной проволочной лигатурой была проведена хирургическая операция на животных. Проведенные эксперименты позволили прийти к следующему заключению:

1. Благодаря ячеистой структуре остеопластического материала *chronOST<sup>TM</sup>* уже на 7 сутки гистологического анализа можно было наблюдать миграцию кровеносных сосудов в ячейки *chronOST<sup>TM</sup>*, а к 40 суткам во всех ячейках сформировалась сообщающаяся система микроциркуляторного русла.

2. Иммунологическая реакция организма тест-системы на чужеродный агент, которым являлся остеопластический материал *chronOST<sup>TM</sup>*, наблюдалась на 7 и 21 сутки, к 40 суткам количество мононуклеаров было резко снижено до единичных клеток.

3. Показана способность остеопластического материала *chronOST<sup>TM</sup>* подвергаться резорбции, что в конечном итоге приводит к полному замещению *chronOST<sup>TM</sup>*

*de novo* образованной костной тканью. Было выявлено, что активную роль в этом процессе выполняют гигантские клетки Пирогова—Лангханса. Уже к 7-м суткам была отмечена миграция клеток Пирогова—Лангханса со стороны прилежащей к остеопластическому материалу *chronOS*<sup>TM</sup> мышечной ткани. Количество клеток Пирогова—Лангханса выражено увеличивалось к 21 и 40 суткам и в каждом случае большее их количество регистрировалось в области *chronOS*<sup>TM</sup> со стороны прилежащей мышечной ткани.

4. Анализируя морфологическую структуру *de novo* образованной костной ткани с учетом области ее локализации, начиная с 21 суток, мы обнаружили в организме тест-системы три независимых источника остеогенеза.

5. Основным источником клеток, обладающих остеогенным потенциалом, явились низкодифференцированные фибробластоподобные клетки, которые наблюдались уже на 7 сутки гистологического анализа со стороны прилежащей к остеопластическому материалу *chronOS*<sup>TM</sup> мышечной ткани. На более поздние сроки гистологического анализа низкодифференцированные фибробластоподобные клетки активно мигрируют и заполняют ячейки *chronOS*<sup>TM</sup>, в которых отмечалась дифференцировка этих клеток в остеобласты, образующих костный матрикс. Следует отметить, что уже на 21 сутки гистологического анализа в отдельных ячейках *chronOS*<sup>TM</sup> наблюдалась *de novo* образованная молодая ретикулофиброзная костная ткань. А к 40 суткам отмечалась морфологическая перестройка структуры ретикулофиброзной костной ткани в более зрелую пластинчатую кость. Вероятно, остеопластический материал *chronOS*<sup>TM</sup>, обладая физико-химическими свойствами, идентичными костной ткани, способствует миграции низкодифференцированных клеток и обеспечивает их дифференцировку в остеобласты.

6. Другим источником клеток, обладающих остеогенным потенциалом, являются клетки надкостницы костного ложа. Уже на 21 и 40 сутки гистологического анализа наблюдались участки *de novo* образованной ретикулофиброзной костной ткани со стороны костного ложа. На 120 сутки, в большей части ячеек *chronOS*<sup>TM</sup> со стороны костного ложа отмечалась более зрелая пластинчатая *de novo* образованная кость.

7. Также были отмечены в ячейках остеопластического материала *chronOS*<sup>TM</sup> участки *de novo* образованной ретикулофиброзной костной ткани по морфологическим признакам не имеющих отношение ни к одному из выше перечисленных источников остеогенеза. Можно предположить, что третьим источником клеток остеогенеза являются малодифференцированные периваскулярные клетки.

8. Результаты гистологического анализа на 120 сутки позволили регистрировать факт, что большая часть площади остеопластического материала

*chronOS*<sup>TM</sup> заместились *de novo* костной тканью, имеющей структуру зрелой пластинчатой кости.

9. Важно отметить, что во всех случаях на 120 сутки в *de novo* образованной кости сформировались участки красного костного мозга, из чего следует, что *de novo* образованная костная ткань обладает не только опорной функцией, но также является органом кроветворения.

10. Нами также был отмечен факт, в случае, если контакт между остеопластическим материалом и костным ложем недостаточно плотный и или в области контакта недостаточное кровоснабжение, то остеохондрогенные клетки надкостницы дифференцируются в хондробласты, итогом чего является формирование гиалинового хряща. Поэтому важно во время трансплантации, прежде, обеспечить хороший контакт остеопластического материала *chronOS*<sup>TM</sup> с костным ложем.

11. Результаты гистологического анализа на разных сроках остеointegrации показали, что остеопластический материал *chronOS*<sup>TM</sup> обладает рядом преимуществ, позволяющих обеспечить этому материалу приоритет перед другими остеопластическими материалами.

Однако использование этого материала в травматологии и ортопедии, по нашему мнению, не всегда возможно в связи с его резорбируемостью. Основной задачей при реконструкции любой кости является то, что она должна быть восстановлена по анатомическому и физиологическому соответствию, особенно в местах диастаза. В связи с чем предполагается дальнейшее изучение процесса остеointegrации с использованием нерезорбируемого остеопластического материала с заселением его аутологичными МСК.

Учитывая совокупность биологических критериев предполагается получить кость, состоящую из кальция фосфата, гидроксиапатита или других материалов, заселенных сфероидными из МСК, которая фактически будет являться собственной костью, т.е. «золотым стандартом» трансплантологии за исключением важного аспекта: она не резорбируется, тем самым позволяет сохранить все свойства собственной кости и постоянную геометрию.

Изучение механизмов репаративного остеогенеза, являющегося ключевой теоретической проблемой клиники травматологии и ортопедии, в течение последних десятилетий находится в центре внимания специалистов различного профиля. За этот период, в качестве потенциальных стимуляторов остеогенеза, были испытаны сотни биологически активных препаратов и факторов.

Благодаря использованию новейших биохимических и биофизических методик, предложен ряд аргументированных механизмов, детальное изучение которых позволит раскрыть интимные стороны биохимии и физической химии процесса минерализации. Интерес к данному вопросу обусловлен как необходимостью познания ее закономерностей, так и возможностью влиять на механизмы ее регуляции.

## Список литературы

1. **Волошин В.П., Мартыненко Д.В., Лекишвили М.В.** Способ лечения вертлужной впадины. 2004; Патент РФ: 2289339.
2. **Денисов-Никольский Ю.И., Миронов С.П., Омеляненко Н.П., Матвейчук И.В.** Актуальные проблемы теоретической и клинической остеоартрологии. — М., 2005.
3. **Корж А.А.** Репаративная регенерация кости / А.А. Корж, А.М. Белоус, Е.Я. Панков. — М.: Медицина, 1972. — 232 с.
4. **Корж Н.А., Романенко К.К., Горидова Л.Д.** Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Нарушение регенерации (Сообщение 2). Ортопед. Травматология. — 2006. — 1. — С. 84-90. Медицина сьогодні і завтра.
5. **Лаврищева Г.И.** Морфологические и клинические аспекты репаративной регенерации опорных органов и тканей / Г.И. Лаврищева, Г.А. Оноприенко. — М.: Медицина, 1996. — 208 с.
6. **Лекишвили М.В.** Технологии изготовления костного пластического материала для применения в восстановительной хирургии: Дисс. на соискание ученой степени д.м.н. — М., 2005.
7. **Лекишвили М.В., Родионова С.С., Ильина В.К.** и др. Основные свойства деминерализованных аллоимплантатов, изготавливаемых в тканевом банке ЦИТО // Вестник травматологии и ортопедии. — 2007. — 3. — С. 80-86.
8. **Орлов А.А., Ипполитов В.П., Сабурова И.Н., Репин В.С.** и др. Экспериментальное моделирование 3-D заданного остеогенеза костной ткани на базе аутологичных культур плюрипотентных мезенхимальных стромальных клеток крыс и остеопластических материалов для устранения дефектов кости // Маэстро стоматологии. — 2008. — 1(27). — С. 6-12.
9. **Панасюк А.Ф., Ларионов Е.В.** Хондроитинсульфаты и их роль в обмене хондроцитов и межклеточного матрикса хрящевой ткани // Науч.-практ. Ревматология. — 2000. — 2. — С. 46-55.
10. **Панасюк А.Ф., Лекишвили М.В., Ларионов Е.В.** и др. Биоматериалы для восстановления костных дефектов на основе костных аллоколлагена, гидроксиапатита и сульфатированных гликозаминогликанов. Мат. II Всероссийского симп. с межд. уч.: «Клинические и фундаментальные аспекты тканевой терапии». — Самара, 2004. — С. 43-44.
11. **Серов В.В., Шехтер А.Б.** Соединительная ткань. — М.: Медицина; 1981. — С. 103-122.
12. **Снетков А.И., Лекишвили М.В., Касымов И.А.** и др. Использование пластического материала «Перфост» в клинике детской костной патологии // Вестник травматологии и ортопедии. — 2003. — 4. — С. 74-79.
13. **Ткаченко С.С., Руцкий В.В.** Электростимуляция остеорепарации. — М.: Медицина, 1989. — 208 с.
14. **Щепкина Е.А., Кругляков П.В., Соломин Л.Н.** и др. Трансплантация аутологичных мезенхимальных стволовых клеток на деминерализованном костном матриксе при пластике ложных суставов и костных дефектов. Мат. III Всероссийского симп. с межд. уч.: «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии». — М., 2007. — С. 113.
15. **Bredt J.F., Sach E., Brancazio D.** et al. Three dimensional printing sistem.1998; US Patent: 5807437.
16. **Hull C.** Method for production of three-dimensional objects by stereolithography. 1990; US Patent: 4929402.
17. **Ioannis V. Yannas.** Tissue And Organ Regeneration In Adults. Pub. Date: November 2010; Springer-Verlag New York, LLC.
18. **Landers R., Pfister A., Hubner U.** et al. Fabrication of soft tissue engineering scaffolds by means of rapid prototyping techniques // J. Mater. Sci. — 2002. — 37. — P. 3107-3116.
19. **Sachlos E., Czernuszka J.T.** Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid free-form fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds // Europ. Cells Materials. — 2003. — 5. — P. 29-40.
20. **Salai M., Brosh T., Keller N.** et al. The effects of prolonged cryopreservation on the biomechanical properties of bone allografts: A microbiological, histological and mechanical study // Cell and Tissue Banking. — 2000. — 1. — P. 69-73.
21. **Taboas J.M., Maddox R.D., Krebsbach P.H., Hollister S.J.** Indirect solid free form fabrication of local and global porous, biomimetic and composite 3D polymer-ceramic scaffolds // Biomaterials. — 2003. — 24. — P. 181-194.
22. **Vacanti J.P., Langer R., Upton J., Marler J.J.** Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration // Adv. Drug Deliv. Rev. — 1998. — Aug. 3. — 33(1-2). — P. 165-182.

Поступила 15.02.13

## Сведения об авторах:

**Боровков Валентин Николаевич**, д-р мед. наук, зав. 1-м травматологическим отделением ГБУЗ «ГКБ №71 ДЗМ», вед. науч. сотр. лаб. трансляционной медицины ФГУЗ НИИОПП РАМН

**Еремин Александр Викторович**, ординатор 1-го травматологического отделения ГБУЗ «ГКБ №71 ДЗМ»

**Орлов Андрей Алексеевич**, д-р мед. наук, зав. лаб. трансляционной медицины, вед. науч. сотр. ФГБУ НИИОПП РАМН

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

© Р.А. Копаладзе, 2013  
УДК 616.853-0.92.4

Р.А. Копаладзе

## Система оценки тяжести эпилептиформной реакции, индуцируемой ультразвуком у крыс

Федеральное государственное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАМН, 125215, Москва, Балтийская, 8

*Разработан метод индукции эпилептиформной реакции у крыс с помощью ультразвука (24,3 кГц; 116 дБ) и система оценки тяжести эпилептиформной реакции. Ультразвук — частота выше 20 кГц — абсолютно бесшумный для человека, вызывает эпилептиформную реакцию у 6—13% крыс. Показаны возможности использования ультразвуковой эпилепсии у крыс для оценки противосудорожной активности лекарственных препаратов.*

**Ключевые слова:** ультразвуковая эпилепсия, крысы, тяжесть эпилептиформной реакции, судорожные припадки, девятибалльная шкала, карбамазепин

R.A. Kopaladze

## The system of assessment of the severity of ultrasound epilepsy in rats

Federal State Budgetary Institution «Institute of general pathology and pathophysiology» of Russian Academy of Medical Sciences: 125315 Moscow, Baltijskaya 8, Russia

*The method of induction of epileptic reactions in rats by ultrasound (24.3 kHz; 116dB) and the system of severity estimation of epileptic reaction was developed. Ultrasound — frequency above 20 kHz — absolutely silent for a person, may cause epileptic reaction in 3—9% of the rats. The possibility of using ultrasound — induced epilepsy in rats to evaluate anticonvulsant activity of drugs it is shown*

**Key words:** ultrasound-induced epilepsy, rats, the severity of the seizure, convulsive seizure, 9-points scale, carbamazepine

К числу экспериментальных моделей эпилепсии относится так называемая аудиогенная эпилепсия. Под аудиогенной эпилепсией понимаются варианты эпилепсии, при которых генерализованные припадки как у человека так и у животных возникают под влиянием резкого звукового раздражителя [1, 2, 4]. Аудиогенная эпилепсия у крыс Wistar, впервые была описана американским ученым Г. Дональдсоном в 20-е годы прошлого века [10]. Отметим, что именно Дональдсоном впервые в 1906 г. в Вистаровском институте США была выведена популяция белых крыс Wistar, широко используемых во всем мире [6]. В 40-х годах XX века в СССР на биологическом факультете Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова на основе крыс Wistar была выведена линия крыс КМ, генетически предрасположенных к аудиогенной эпилепсии [2, 4]. Позже, в 1958 г., аналогичная генетическая модель звуковой эпилепсии была создана в США в Университете Аризоны на основе крыс Sprague—Dowley [5, 11].

**Для корреспонденции:** Копаладзе Реваз Александрович, канд. биол. наук, старш. научн. сотр. лаб. биохимических адаптаций ФГБУ «НИИ ОПП» РАМН. E-mail: revazkop@mail.ru

В работах для индукции аудиогенной эпилептиформной реакции у крыс, как правило, используется слышимое для человека звуковое раздражение частотой до 20 кГц и силой 90—120 дБ (обычный сильный электрический звонок). Однако регулярное использование сильного звукового раздражителя крайне неприятно, оказывает вредное влияние на здоровье экспериментатора и окружающих. При этом требуется специальная прозрачная звуконепроницаемая камера из плексигласа с двойными стенками и с смонтированным в потолок электрическим звонком. Внутри камеры помещается подопытное животное. И, тем не менее, устранить полностью влияние звука на экспериментатора невозможно. Предлагаемый метод индукции эпилептиформной реакции с использованием ультразвукового раздражителя лишен этих недостатков. Звуковой раздражитель частотой излучения выше 20 кГц — ультразвук — абсолютно бесшумный для человека, может вызывать у крыс эпилептиформную реакцию.

Тяжесть аудиогенной эпилептиформной реакции, вызываемой обычным звуковым раздражителем (электрический звонок), как правило, оценивают по

форме проявления припадка, по 4-балльной шкале [2, 4], или по 9-балльной шкале, в которой учитывается не только форма проявления припадка, но и количество волн возбуждения (2 или 1), предшествующих припадку [9, 11]. Предлагаемый нами подход отличается тем, что в 9-балльной системе учитывается не только форма припадка и количество волн возбуждения (2 или 1), но и продолжительность тормозной паузы между двумя волнами возбуждения.

*Цель работы* — доказательство возможности использования ультразвука для создания экспериментальной модели эпилепсии на крысах и разработка системы оценки тяжести эпилептиформной реакции.

### Методика

*Отбор животных, чувствительных к ультразвуку*

Нелинейные белые крысы содержались в стандартных условиях вивария по 10 особей в клетке. Еду и питье животные получали *ad libitum*. Все процедуры и эксперименты на животных проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Министерства здравоохранения РФ №267 от 19.06.2003 г.

Эпилептиформные припадки у нелинейных белых самцов крыс вызывали с помощью ультразвукового раздражителя Dazer II (США, частота излучения 24,3 кГц, уровень звука 116 дБ). Для этого крысу помещали в пластмассовый бачок высотой 46 см и диаметром нижней и верхней частей 32 и 36 см соответственно. Бачок закрывали сверху металлической сеткой и направляли «луч» сигнала на крысу вертикально с расстояния одного метра в течение не более 90 с. Ультразвуком действовал непрерывно и отключался в момент наступления припадка. Для подбора чувствительных животных было протестировано 335 нелинейных белых крыс возрастом 1,5 мес., массой 160—200 г. Среди этих крыс сначала были выделены 30 крыс, давших эпилептиформную реакцию на ультразвук. Однако цель отбора заключалась не только в том, чтобы выделить группу крыс чувствительных к ультразвуку, но и в том, чтобы выделенные крысы стабильно давали эпилептиформную реакцию в ответ на ультразвук. Для этого крыс тестировали 1 раз в неделю и после каждого тестирования крысы, не давшие ответную реакцию на ультразвук, исключались из дальнейшего тестирования. В конце первого месяца тестирования выявилось, что у 23 крыс реакция на ультразвук носила нерегулярный характер, и они были исключены из дальнейшего тестирования. После этого из оставшихся 7 крыс в конце 2-го мес. тестирования были выделены две крысы, регулярно дававшие эпилептиформную реакцию на ультразвук с выраженными судорожными припадками абсолютно

во всех испытаниях. Эти крысы были протестированы 14 раз до испытания противоэпилептического средства карбамазепина.

### *Параметры ультразвуковой эпилептиформной реакции*

Эпилептиформная реакция у крыс, вызываемая ультразвуком, протекает в виде двух- или одноволнового возбуждения, завершающегося судорожным припадком. Период между двумя волнами возбуждения представляет собой активное торможение, которое может временно оборвать двигательное возбуждение (ДВ), предшествующее судорожному припадку. Однако после истощения этого торможения в результате непрерывного действия ультразвука возникает вторая волна ДВ, завершающаяся клоническими и/или тоническими судорожными припадками. В этом случае мы имеем дело с 2-волновой реакцией возбуждения. Наличие тормозной паузы (ТП) между двумя волнами возбуждения указывает на эффективную работу тормозных механизмов мозга против патогенного действия ультразвука на животных. Если продолжительность ТП=0, то мы имеем дело с 1-волновой реакцией возбуждения, которая является более тяжелой формой УЭР по сравнению УЭР с 2-волновой реакцией.

Понятие ультразвуковая эпилептиформная реакция (УЭР) включает в свою структуру следующие параметры:

- 1) латентный период двигательного возбуждения (ЛДВ), т.е. продолжительность времени в секундах от момента включения ультразвука до начала двигательного возбуждения;
- 2) латентный период наступления судорожного припадка (ЛСП), т.е. продолжительность времени от момента включения ультразвука до наступления судорожного припадка;
- 3) тяжесть УЭР в баллах, т.е. форму проявления припадка с учетом количества волн ДВ.

Также учитывалось ДВ без припадка и полное отсутствие реакции.

### *Фармакологическое тестирование*

Эффекты противоэпилептического средства карбамазепина, препарата, включенного в перечень жизненно необходимых препаратов [3], были проверены на отобранных крысах, стабильно чувствительных к индукции эпилептиформной реакции ультразвуком. Исследования проводили на животных, достигших взрослого возраста. Для подготовки суспензии 20 мг карбамазепина помещали в фарфоровую ступку, добавляли две капли твина и растирали фарфоровым пестиком. Затем добавляли 2 мл физиологического раствора (ФР) и вновь растирали пестиком до получе-



ния однородной гомогенной среды с конечной концентрацией 10 мг/мл. Суспензию карбамазепина вводили крысе внутривентриально в дозе 20 мг/кг в объеме 2 мл на кг массы. Контрольной крысе вводили такой же объем ФР с твином. Эксперименты на опытной и контрольной крысах проводили еженедельно, в течение 6 нед.

### Результаты и обсуждение

#### Модифицированная девятибалльная шкала оценки тяжести ультразвуковой эпилептиформной реакции (УЭР) у крыс

Разработанная система оценки тяжести УЭР представлена в таблицах 1А и 1Б. В основной таблице 1А представлены формы припадков и соответствующие баллы с учетом количества волн возбуждения. В дополнительной таблице 1Б — данные для учета продолжительности ТП между волнами возбуждения (с).





Таблица 1А состоит из четырех столбцов: в столбце I дано словесное описание УЭР, в столбце II представлены формы припадков в виде рисунков в соот-

ветствии с описанием, в столбце III — количество волн (2 или 1), предшествующих судорожному припадку, и в столбце IV — баллы (0—9), отражающие тяжесть УЭР. Если в ответ на ультразвук крыса не реагирует, то в соответствии с данными таблицы 1А пишется «0» баллов, а если крыса на звук реагирует только ДВ, без припадков, пишется «1» балл (количество волн при этом не учитывается). Но, когда у крысы 1-волновое ДВ завершается судорожным припадком, то в зависимости от формы припадков находят в соответствующей строке число баллов 3; 5; 7; 9 (они выражены нечетными числами).

В случае 2-волновой реакции возбуждения, завершающегося судорожным припадком, помимо формы припадков учитывается продолжительность ТП между этими волнами. В этом случае возникает необходимость определения конкретного числа баллов в интервалах: 2,1—2,9; 4,1—4,9; 6,1—6,9 и 8,1—8,9. Каждому отдельному интервалу соответствует вполне определенная форма припадков. Для того, чтобы определить конкретное число баллов в указанных интервалах, используется другая таблица 1Б.

Девятибалльная шкала оценки тяжести ультразвукового эпилептического припадков (УЭП) у крыс

Таблица 1А

Тяжесть УЭП рисунки	Тяжесть УЭП Описание	Число волн возбуждения 2 или 1	Тяжесть УЭП баллы
I	II	III	IV
-	Нет реакции вообще	0	0
-	Двигательное возбуждение без припадков	2 или 1	1
	Судорожные клонические припадки с падением животного на брюшко	2 1	2,1÷2,9 3
	Судорожные клонические припадки с падением животного на бок.	2 1	4,1÷4,9 5
	Судорожные припадки с падением животного на бок с тоническим напряжением передних лап	2 1	6,1÷6,9 7
	Судорожные припадки, с падением животного на бок с тоническим напряжением всех лап	2 1	8,1÷8,9 9

Продолжительность тормозной паузы (ТП) между двумя волнами возбуждения в секундах и условных единицах

Продолжительность ТП в секундах	Продолжительность ТП в условных единицах
Столбец I	Столбец II
2,3	0,9
4,5	0,8
6,7	0,7
8,9	0,6
10,11	0,5
12,13	0,4
14,15	0,3
16,17	0,2
18,19	0,1

Таблица 1Б состоит из двух столбцов I и II. В столбце I представлена в возрастающем порядке продолжительность ТП в секундах (2—19 с). Такая продолжительность ТП наиболее часто встречается в экспериментальной практике. Существует обратная пропорциональная связь между продолжительностью ТП в секундах и тяжестью УЭР в баллах: чем меньше продолжительность ТП в секундах, тем больше тяжесть УЭР и наоборот. Поэтому в столбце II этой же таблицы продолжительность ТП представлена в виде убывающих сверху вниз девяти дробных условных единиц (0,9—0,1). Введение условных единиц позволяет представить различную продолжительность ТП (2—19 с) в удобной для расчетов форме. Представление секунд в возрастающем, а условных единиц — в убывающем сверху вниз порядке дает возможность установить *прямую зависимость* между продолжительностью ТП в условных единицах (0,1—0,9) и тяжестью припадка (2—9). Это необходимо для отражения продолжительности ТП с помощью дробных переходных чисел между четными и нечетными числами 9-балльной шкалы.

*Примеры использования модифицированной системы оценки тяжести УЭР*

*Пример №1.* Крыса в ответ на ультразвук дает 2-волновую реакцию возбуждения с продолжительностью ТП=4 с, с формой припадка в виде «падения животного на бок, тоническим сгибанием шеи, туловища и передних конечностей, неполным тоническим напряжением задних конечностей». В этом случае тяжесть припадка определяют следующим образом: на таблице 1А в столбцах I или II находят соответствующее указанной реально наблюдаемой форме припадка описание или рисунок — в данном примере, строка №5. Затем на этой же строке, в столбце III находят цифру, обозначающую число волн, т.е. число «2», а в столбце IV на этой же строке, рядом с числом «2» находят интервал между циф-

рами 6,1—6,9 в пределах которого и лежит число, отражающее тяжесть припадка в баллах. Для того, чтобы определить это число, используется таблица 1Б. На этой таблице в столбце «секунды» (столбец I) находят число «4» (так как в данном примере ТП=4 с), а затем на этой же строке в столбце II находят соответствующее условное дробное число «0,8». Затем определяется конкретное число баллов путем суммирования найденного на таблице 1А целого числа «6» и найденного на таблице 1Б дробного числа «0,8». В результате сложения этих двух цифр (6+0,8) получаем искомое число — 6,8 балла. Следует подчеркнуть, что без учета продолжительности ТП число баллов соответствовало бы «6», тогда как с учетом продолжительности ТП это число соответствует «6,8» т.е. числу, которое ближе к 7 баллам.

*Пример №2.* Реакция носит 1-волновый характер (т.е. ТП=0), но форма (тяжесть) припадка не отличается от припадка, приведенного в примере №1 (соответствует описанию в строке №5). В этом случае в столбце III находят число волн, т.е. число «1», и на этой же строке уже в столбце IV находят число «7», отражающее тяжесть припадка в баллах (использование таблицы 1Б в этом случае не требуется).

Новизна 9-балльной системы оценки тяжести УЭР состоит в том, что в случае 2-волновой реакции возбуждения между целыми числами (четными и нечетными), отражающими тяжесть припадка в баллах, нами впервые вводятся переходные, дробные числа, что повышает точность оценки тяжести УЭР и биологической активности лекарств в случаях их тестирования на животных, чувствительных к действию звука.

*Характеристика отобранных животных*

В наших экспериментах количество крыс чувствительных к ультразвуку в зависимости от партии крыс (97, 122, 116 крыс) составляло 6,2%; 7,4%; и 13%, а в — среднем 9%. Эпилептиформная реакция в ответ на ультразвук у большинства отобранных крыс

носила неустойчивый характер. Однако проверку на еженедельное тестирование выдержали только 2 крысы, которые и в дальнейшем демонстрировали устойчивый ответ на действие ультразвука по всем показателям УЭР при повторных измерениях.

Многолетний опыт автора и многих других исследователей показывает, что многократное использование линейных крыс с аудиогенной эпилепсией для испытания лекарств, вполне возможно. Эти крысы дают стандартную эпилептиформную реакцию в различные дни недели в ответ на действие звукового раздражителя частотой в слышимом для человека диапазоне (обычный сильный электрический звонок, 20 кГц, 90—120 дБ). Важно подчеркнуть, что между отобранными нами двумя крысами было различие в постприпадочных поведенческих реакциях на ультразвук. У опытной крысы судорожное состояние характеризовалось кататоническим ступором, у контрольной — судорожный припадок сопровождался выраженной взрывной наступательной агрессией и вокализацией. Эти животные были использованы для оценки противосудорожного эффекта карбамазепина.

### Эффект карбамазепина

Влияние карбамазепина в сравнении с введением ФР продемонстрировано на опытном и контрольном животных в эксперименте по следующей схеме: за 48 ч до введения карбамазепина или ФР, через 1 ч и через 24 ч после введения препаратов. Результаты экспериментов по оценке влияния карбамазепина на УЭР представлены в табл. 2. Под противосудорожным эффектом понимается главным образом увеличение ЛДВ и уменьшение тяжести УЭР, а также увеличение ЛСП. При оценке тяжести УЭР в баллах были использованы представленные выше таблицы 1А и 1Б.

Из представленных в табл. 2 данных видно, что опытное и контрольное животные до постановки опыта реагировали на ультразвук эпилептиформной реакцией. Введение карбамазепина оказало противосудорожное действие — крыса переставала реагировать на действие ультразвука в течение 90 с. Опыт показывает, что, если крыса в течение этого времени не реагирует на звук, то она не реагирует на него вообще.

В этом случае в графах ЛДВ и ЛСП проставлено значение «90+», что означает отсутствие ДВ и судорожного эффекта.

Таблица 2

Параметры УЭР у крыс с введением карбамазепина и физиологического раствора

Время тестирования	№ недели тестирования	Параметры УЭР					
		ЛДВ, с		ЛСП, с		Тяжесть УЭР, баллы	
		Карбамазепин	ФР	Карбамазепин	ФР	Карбамазепин	ФР
За 48 ч до введения препаратов	1	6	17	12	37	9,0	6,6
	2	12	14	16	33	7,0	6,6
	3	9	13	31	23	9,0	7,0
	4	8	15	17	35	9,0	8,6
	5	9	19	16	28	9,0	9,0
	6	8	21	19	30	9,0	5,0
M±SD		8,7±2,0	16,5±3,1	18,5±6,5	31,0±5,1	8,7±0,8	7,1±1,5
Через 1 ч после введения препаратов	1	90+ (нет реакции)	15	90+ (нет реакции)	19	0	7,0
	2	90+ (нет реакции)	16	90+ (нет реакции)	35	0	6,8
	3	90+ (нет реакции)	9	90+ (нет реакции)	27	0	8,4
	4	90+ (нет реакции)	15	90+ (нет реакции)	28	0	8,9
	5	90+ (нет реакции)	11	90+ (нет реакции)	18	0	9,0
	6	90+ (нет реакции)	19	90+ (нет реакции)	36	0	6,9
M±SD		—	14,2±3,6	—	27,2±7,6	0	7,8±1,0
Через 24 ч после введения препаратов	1	11	14	20	21	3,0	9,0
	2	10	13	35	32	6,2	8,5
	3	9	19	28	33	4,7	9,0
	4	11	11	28	34	5,0	7,0
	5	12	13	45	18	4,6	9,0
	6	15	19	32	39	6,5	6,9
M±SD		11,3±2,1	14,8±3,4	31,3±8,4	29,5±8,2	5,0±1,3	8,2±1,0

Примечание. ЛДВ — латентный период двигательного возбуждения; ЛСП — латентный период наступления припадка; УЭР — тяжесть ультразвуковой эпилептиформной реакции. Число «90+» означает отсутствие УЭР у крыс на действие ультразвука в течение 90 с и более; цифра «0» — полное отсутствие реакции на ультразвук. М — среднее; SD — стандартное отклонение.

рожного припадка в течение 90 с и более. В графе тяжесть УЭР в баллах в этом случае проставляют цифру «0». Однако через 24 ч после введения карбамазепина реакция животного на ультразвук восстанавливалась.

По приведенным в табл. 2 данным видно, что через 24 ч после введения карбамазепина параметры УЭР отличаются от фоновых в сторону снижения уровня возбудимости и затруднения возникновения УЭР, что выражается в увеличении продолжительности ЛСП и, что особенно важно, в снижении тяжести УЭР в баллах. У контрольной крысы существенных изменений параметров УЭР не наблюдалось. Итак, в приведенном примере карбамазепин в дозе 20 мг/кг предотвращал возникновение УЭР у крысы через 1 ч после его введения, а через 24 ч его действие резко ослабевало. Карбамазепин может служить надежным маркером при испытании противосудорожных средств на животных, демонстрирующих вызванную ультразвуком эпилептиформную реакцию.

Ценность предложенного подхода заключается в том, что, не вводя животному никаких эпилептогенных химических препаратов, не используя таких сильных электрических раздражителей, как электрический ток, и не нарушая целостность нервной системы, можно получить на ультразвук генерализованные эпилептиформные припадки, весьма сходные по внешним проявлениям с эпилептическими припадками у человека. Кроме того, преимущество данного метода индукции эпилептиформной реакции состоит в том, что частота ультразвука лежит за пределами слышимости человека-экспериментатора.

#### *Возможности использования предлагаемых методов и перспективы*

Ультразвук безвреден для здоровых крыс, но вызывает эпилептиформную реакцию у крыс, генетически предрасположенных к эпилепсии. Метод индукции эпилептиформной реакции с использованием ультразвукового раздражителя может быть использован для предварительного тестирования партий крыс в возрасте 1,5 мес., предназначенных для научного проекта, с целью освобождения их от «нежелательных» особей. В этом случае экспериментатор, отбирая крыс, делает основную группу крыс более однородной и свободной от крыс с неврологическими отклонениями. С другой стороны, он приобретает дополнительную, небольшую группу крыс, позволяющую учитывать изменение параметров УЭР у животных, чувствительных к ультразвуку. В то же время метод индукции эпилептиформной реакции с использованием ультразвукового раздражителя и система оценки тяжести УЭР могут быть использованы при работе с аудиогенными крысами инбредной линии КМ и линии WAG/Rij, наиболее часто используемыми в отечественной практике, а также для других линий крыс

и мышей, генетически предрасположенных к аудиогенной эпилепсии.

Одной из методологических основ современной экспериментальной биологии и медицины является концепция генетической стандартизации лабораторных животных с целью получения воспроизводимых результатов. Уже получены сотни различных линий инбредных животных, главным образом мелких лабораторных грызунов [7]. Исследования с использованием инбредных линейных животных с заранее заданными генетическими характеристиками позволяют повысить эффективность научных исследований и способствуют сокращению количества подопытных животных [8]. В свете сказанного представляется перспективным выведение крыс инбредной линии, генетически предрасположенной к ультразвуковой эпилепсии. На основании данных, приведенных в настоящей работе, можно полагать, что в рамках предложенной модели ультразвуковой эпилепсии и системы оценки тяжести припадка в последующем возможно выведение как минимум крыс двух линий — с кататоническим ступором и с взрывной наступательной агрессией.

#### Список литературы

1. **Копаладзе Р.А.** Экспериментальные модели эпилепсии и внутриутробного дизонтогенеза. Проблемы биоэтики. — М., 2008: Деп. в ВИНТИ. №569-В2008. — 280 с.
2. **Крушинский Л.В.** Новое в изучении экспериментальной эпилепсии и физиологических механизмов, лежащих в ее основе // Успехи современной биологии. — 1949. — Т. XXVIII. — Вып. 1. — С. 108-133
3. Распоряжение Правительства РФ от 7 декабря 2011 г. №2199 р.г.Москва // Российская газета — Федеральный выпуск. — 2011. — №5660.
4. **Семиохина А.Ф., Федотова И.Б., Полетаева И.И.** Крысы линии КМ: исследования аудиогенной эпилепсии, сосудистой патологии и поведения // Журнал ВНД. — 2006. — №3. — С. 298-316.
5. **Consroe P., Piccioni A., Chin L.** Audiogenic seizure susceptible rats // Fed. Proc. — 1979. — Vol. 38. — №10. — P. 2411-1216.
6. **Donaldson H.H.** The history and zoological position the albino rat // J. Acad. Nat. Sci. Phila. — 1912. — Vol. 15. — P. 315-369.
7. **Festing M.F.W.** International index of laboratory Animals, 6<sup>th</sup> ed. — 1993.
8. **Festing M.F.W.** The choice of animal models and reduction // ATLA. — 2004. — Vol. 32. — Прилож. 2. — P. 59-64
9. **Jobe P.C., Piccioi A.L., Chin L.** Role of brain hydroxytryptamine in audiogenic seizure in the rat. // Life Sci. — 1973. — Vol. 13. — P. 1-13.
10. **Krushinsky L.V., Molodkina L.N., Fles D.A.** et al. The functional state of the brain during sonic stimulation In: Physiological Effects of Noise. Plenum, New York. — 1970. — P. 159-183.
11. **Tacke U.** Audiogenic seizures in rats — an experimental study of a genetic model of epilepsy. Department of Pharmacology and Toxicology University of Kuopio. — Kuopio, 1984. — 134 p.

*Поступила 24.05.13*

14 марта 2013 года на 91-м году ушел из жизни крупнейший ученый-медик, лидер мировой патофизиологии, выдающийся организатор науки, заслуженный деятель науки Российской Федерации, академик РАН

## Георгий Николаевич КРЫЖАНОВСКИЙ



Вся творческая жизнь Георгия Николаевича связана с Институтом общей патологии и патофизиологии РАН, в котором он прошел путь от аспиранта до директора, став преемником таких выдающихся ученых, как А.Д. Сперанский, В.Н. Черниговский, В.В. Парин, А.М. Чернух. Творческая биография Г.Н. Крыжановского, по сути, биография этого института.

Академик РАН Г.Н. Крыжановский своим многолетним творческим служением медицинской науке внес неоценимый вклад в ее дальнейшее развитие. Согласно представлениям Г.Н. Крыжановского, при патогенных воздействиях и повреждениях различных звеньев нервной системы, помимо выпадения функций, возникает ранее неизвестный эффект — формирование патологических интеграций из первично и вторично измененных структур ЦНС. На уровне межнейронных взаимодействий такой интеграцией является агрегат гиперактивных нейронов, продуцирующих усиленный, неконтролируемый поток импульсов и представляющий собой *генератор патологически усиленного возбуждения*. Генератор существенно изменяет функциональное состояние связанных с ним нервных структур и вместе с ними образует *патологическую детерминанту*, которая *формирует патологическую систему*. Патологическая система представляет собой патобиологическую основу и патофизиологический механизм развития патологических процессов и возникновения нейропатологических синдромов. Нейропатологические синдромы являются клиническим выражением деятельности лежащих в их

основе патологических систем. Формирование гомо- и гетерологических интеграций является общей закономерностью патологии.

На основе теории генераторных, детерминантных и системных механизмов было создано более 20 моделей нейропатологических синдромов, относящихся к разным сферам деятельности ЦНС — сенсорной, двигательной, эмоциональной, высшей нервной деятельности, поведения и нервно-психических расстройств. За эти исследования Георгию Николаевичу Крыжановскому была присуждена Государственная премия СССР.

Долгое время считалось, что моделирование расстройств деятельности человека невозможно из-за его социальной природы и высочайшей сложности ЦНС человека. Разумеется, болезни человека нельзя воспроизвести у животных, но можно создать модели нейропатологических синдромов, входящих в патогенетическую структуру различных нервно-психических расстройств с учетом видовых и этологических особенностей животных.

Моделирование патологических процессов и различных заболеваний является мощнейшим оружием патофизиологии. Понимание многофакторности патогенеза и разработанная теория генераторных, детерминантных и системных механизмов нервных расстройств позволили Г.Н. Крыжановскому разработать принцип их *комплексной патогенетической терапии*. Этот принцип заключается в сочетании воздействия соответствующих лечебных средств на комплекс патологических систем и на различные зве-

нья патологической системы, а если последняя имеет выход на периферию, то и на измененные органы-мишени, которые являются конечными звеньями патологической системы нервно-соматических расстройств.

Г.Н. Крыжановский подчеркивал, что сами по себе лечебные воздействия далеко не всегда ликвидируют болезнь. Важное значение имеет активация естественных саногенетических механизмов. На основе общебиологического принципа антагонистических отношений в регуляции функций Г.Н. Крыжановский предложил понятие *антисистемы*, предупреждающей формирование или гиперактивацию патологической системы и имеющей значение естественного саногенетического механизма, противодействующего патологической системе и участвующей в ее ликвидации.

Г.Н. Крыжановский развил теорию следовых реакций в патологии, основы которой были заложены академиком РАМН А.Д. Сперанским. Г.Н. Крыжановский показал, что патологические процессы, их патологические системы и детерминанты оставляют после себя в виде следа структурно-функциональные изменения, скрытые благодаря пластическим и компенсаторным механизмам. При патогенных воздействиях, нарушающих саногенетические механизмы и усиливающих скрытые патологические изменения, последние могут реактивироваться и, в результате, возникает рецидив болезни.

Понятие *эндогенизация патологических процессов*, введенное Г.Н. Крыжановским, обозначает индукцию и деятельность эндогенных механизмов, которые возникают на определенной стадии патологического процесса после первичного патогенного воздействия. Механизмы *эндогенизации* формируются и реализуют дальнейшее развитие патологического процесса независимо от этиологического фактора, хотя продолжающееся патогенное воздействие способствует его развитию. *Эндогенез* является общепатологической закономерностью и осуществляется, в той или иной степени, при различных формах патологии в разных системах, органах, тканях и клетках. Особенно он выражен в нервной системе из-за ее структурно-функциональных особенностей и огромной пластичности.

Согласно концепции об *общей и региональной трофических системах*, нейрон, иннервируемая им соматическая клетка и связанные с нейроном глиоциты составляют регионарную трофическую систему или регионарный трофический контур, внутри которого происходит постоянный взаимообмен трофическими веществами между центром и периферией, а также между нейронами. Г.Н. Крыжановский сформулировал понятие «*патотрофогены*», которые уча-

ствуют в индукции устойчивой гиперактивности нейронов, в возникновении и гибели нейронов. Нейротрофическая сеть обуславливает возможность распространения патотрофогенов из первичного патологического очага по нервной сети, что создает предпосылки для генерализации патологического процесса.

Г.Н. Крыжановский сформулировал *принцип перемежающейся активности*. Согласно этому принципу, функционирование клеток, а также внутриклеточных структур, осуществляется не непрерывно, а с перемежающейся активностью. При этом соотношение функционирующих структур и структур, находящихся в состоянии покоя, постоянно изменяется в ходе выполнения функциональной нагрузки.

Другой общебиологический принцип, *принцип двойственной функциональной посылки* был обоснован на примере нервной системы. Согласно этому принципу, в потоке поступающей к нейрону информации имеются как возбуждающие, так и тормозные посылки, что обеспечивает тонкую регуляцию деятельности нейрона. Нарушение двойственной функциональной посылки является одним из типовых патологических процессов в нервной системе. При нарушении тормозного компонента растормаживается и становится патологически выраженным возбуждающий компонент. Двойственная функциональная посылка осуществляется во всех системах организма, в частности, интегративных — эндокринной и иммунной, а также во внутриклеточной усилительной системе. В каждой системе ее осуществляют присущие ей механизмы.

Не только нейроны, но и эндокринные клетки, клетки иммунной системы, соматические клетки, а также их органеллы находятся под постоянным, тоническим тормозным контролем. Контроль снимается при возникновении возбуждения клетки функционально значимыми стимулами.

Теоретические разработки послужили основанием для введения Г.Н. Крыжановским многочисленных новых понятий и терминов. Его значительным вкладом в современную патофизиологию стало создание *общей патофизиологии нервной системы*.

Описанные выше научные достижения были бы невозможны без работы творческого коллектива. Георгий Николаевич обладал удивительной способностью подбирать талантливых сотрудников и объединять их в единый коллектив. Он создал большую научную школу, главным направлением работы которой являются проблемы общей патологии, общей патофизиологии и патофизиологии нервной системы. К его школе принадлежит множество специалистов различного профиля: патофизиологов, неврологов, психиатров, нейрохимиков, биологов. Многие его ученики стали известными учеными, руководителями

научных центров, кафедр, лабораторий. Они работают в различных городах России, на Украине, в Беларуси, Узбекистане, Азербайджане, Армении, Молдове.

Важным этапом для понимания и определения места патофизиологии на современном этапе для Г.Н. Крыжановского и его единомышленников стал Учредительный конгресс Международного общества по патофизиологии (International Society for Pathophysiology) (Москва, 1991). Именно в период его подготовки выкристаллизовалось положение о патофизиологии как интегративной науке — место патофизиологии как теоретической основы медицины, моста между базисными дисциплинами и клинической медициной. Тогда же впервые проблема патологии регуляции была сформулирована как общая идейная основа Конгресса. Президентом Конгресса и первым Президентом созданного на Конгрессе Международного общества по патофизиологии стал Г.Н. Крыжановский.

В 1994 г. Г.Н. Крыжановский совместно с японскими коллегами организовал Международный журнал «Pathophysiology».

Наряду с научной, Г.Н. Крыжановский проводил поистине огромную научно-организационную работу. Он внес значительный вклад в организацию и прогнозирование медико-биологических исследований, координацию деятельности научных учреждений Академии медицинских наук, будучи на протяжении 10 лет академиком-секретарем отделения медико-биологических наук Академии медицинских наук, советником Президиума РАМН (1995—2001 гг.).

На протяжении двух последних десятилетий академик РАМН Г.Н. Крыжановский являлся Президентом Всесоюзного, ныне Российского общества патофизиологов. В течение длительного времени, будучи Президентом Российского общества по изучению боли, внес неоценимый вклад в исследования закономерностей развития патологической боли, Результаты многолетней научной работы академика РАМН Г.Н. Крыжановского отражены более чем в 800 публикациях, в том числе в двух десятках капитальных монографических трудов, имеющих непреходящую ценность для биомедицинской науки.

Более 50 лет Г.Н. Крыжановский участвовал в руководстве ведущим медико-биологическим журналом нашей страны — «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины», являлся заместителем главного редактора журнала «Патогенез», членом редколлегии журналов «Патологическая физиология и экспериментальная терапия», «Российского журнала боли», журнала «Нейроиммунология» и других периодических изданий, членом редакционного совета международного журнала «Pathophysiology».

Оригинальные исследования Георгия Николаевича удостоены высшей награды Российской академии медицинских наук — премии и медали Н.И. Пирогова. Г.Н. Крыжановский награжден рядом медалей зарубежных научных обществ. Его весомый вклад в науку отмечен орденами СССР — Орденом «Дружбы народов» и Орденом «Знак Почета».

Академик РАМН Г.Н. Крыжановский создал действующую научную школу по общей патологии и экспериментальной патофизиологии нервной системы, завоевавшую признание в России и за рубежом. Под его научным руководством защищено свыше 60 докторских и кандидатских диссертаций.

За выдающиеся успехи в воспитании молодых ученых Г.Н. Крыжановский был награжден Высшим Почетным Знаком ВЛКСМ.

Г.Н. Крыжановский — участник Великой Отечественной войны и Парада Победы.

Неутомимая самоотверженная деятельность Георгия Николаевича Крыжановского, его смелость и решительность в науке и на общественном поприще — образец беззаветного служения Делу и Отечеству.

Его талант Ученого, Воспитателя, Организатора и личное обаяние снискали признание, уважение и любовь всех, кому посчастливилось общаться и работать с ним.

Светлая память об Учене и Человеке с большой буквы навсегда сохранится в наших сердцах.

*Коллеги, ученики, редколлегия журнала «Патологическая физиология и экспериментальная терапия».*

## Правила оформления статей для публикации в журнале «Патологическая физиология и экспериментальная терапия»

1. Статьи, оформленные без соблюдения указанных правил, к рассмотрению не принимаются.

2. Все присланные работы обязательно проходят этап научного рецензирования, редакция оставляет за собой право сокращения публикуемых материалов и адаптации их к рубрикам журнала.

3. В редакцию направляются 2 экземпляра рукописи, которые сопровождаются направлятельным письмом учреждения, заверенным ответственным лицом, на имя главного редактора журнала. К рукописи прилагается электронный носитель (диск — CD), содержание которого должно быть идентичным принтерной распечатке.

4. Текст печатается в тестовом редакторе Word шрифтом Times, 14 кеглем, через 1,5 интервала на листе А4. Поля верхнее и нижнее — 2,5 см, поле слева — 3,5 см, поля справа — 1,5. Запрещается использование автоматических переносов. Внизу справа проставляется нумерация страниц.

5. Объем оригинальных статей не должен превышать 8 страниц; обзоров — 15; кратких сообщений — 3 страницы. Исключение — заказные обобщающие статьи, объем которых оговаривается редколлекцией с автором.

6. Оформление титульной страницы:

- имя, отчество, фамилия(и) автора(ов);
- название статьи (без аббревиатуры);
- полное официальное название учреждения и его полный почтовый адрес;
- принадлежность авторов к учреждению обозначается надстрочным индексом в порядке упоминания.

7. Оригинальная статья должна содержать разделы:

- введение (краткое обоснование цели);
- методика (с четким, легко воспроизводимым описанием);
- результаты и обсуждение;
- литература.

8. К оригинальной статье необходимо приложить резюме с ключевыми словами (на русском и английском языках). Резюме должно отражать основное содержание работы. В начале резюме приводятся: УДК, фамилии авторов, затем название статьи. Резюме печатается на отдельной странице.

9. Статья тщательно выверяется автором(ами): формулы, таблицы, дозы визируются авторами на полях, латинские и греческие буквы помечаются на полях (лат., греч.).

10. Статья подписывается всеми авторами. На отдельной странице указываются полные сведения об авторах: ученая степень, ученое звание, должность, кафедра, отделение, почтовый и электронный адреса всех учреждений, телефоны.

11. Количество графического материала должно быть минимальным. Все цифровые данные должны сопровождаться соответствующими единицами в системе единиц СИ.

12. Таблицы должны быть компактными, названия должны точно соответствовать содержанию граф. Сокращения слов не допускается. Данные таблиц не

должны дублироваться графиками и повторяться в тексте статьи.

Обязательно указание методов, программ статистической обработки материала.

13. В формулах должны быть четко размечены все элементы: латинские буквы — синим, греческие — красным; индексы надстрочные ( $A^1$ ) и подстрочные ( $A_1$ ), буквы прописные (A) и строчные (a), сходные буквы и цифры (O, буква, 0, цифра).

14. Аббревиатура допускается только при первоначальном упоминании с указанием полного названия.

15. Цитируемая литература приводится в алфавитном порядке на отдельном листе. В статье, в квадратных скобках, дается ссылка на порядковый номер источника. В списке литературы сначала указываются отечественные авторы, потом иностранные. Работы отечественных авторов, опубликованные на иностранных языках, помещаются среди работ иностранных авторов в общем алфавитном порядке, а работы иностранных авторов, опубликованные на русском языке — среди работ отечественных авторов в общем алфавитном порядке.

Если цитируются несколько работ одного автора, их нужно указывать в хронологическом порядке. Статья, написанная коллективом авторов (более 4 авторов), помещается в списке литературы по фамилии первого автора, при этом указываются еще два автора, а далее ставится «и др.». Если авторов всего 4, то указываются все авторы. После фамилии авторов приводится полное название статьи, источник, год, том, номер, выпуск, страницы (от и до); для книг, сборников, авторефератов и диссертаций обязательно указать их точное название, издательство, город, год.

Книга, написанная коллективом авторов (более 4 человек), помещается в списке по ее названию, а далее через косую черту указываются фамилии трех авторов, далее ставится «и др.». В монографиях иностранных авторов, изданных на русском языке, после названия книги через двоеточие указывается с какого языка сделан перевод. Ссылки на неопубликованные работы, работы для ограниченного пользования, диссертации, рабочие документы ВОЗ не допускаются.

16. Направление в редакцию работ, опубликованных в других изданиях или же посланных для печати в другие редакции, не допускается.

17. Статьи, оформленные не по правилам, возвращаются авторам без рассмотрения.

18. Рукописи, не принятые к печати, авторам не возвращаются.

19. Датой поступления статьи считается время поступления ее окончательного (переработанного) варианта.

20. Плата с аспирантов за публикацию рукописей не взимается.

Статьи направляются по адресу: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8. УРАМН НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН. Редакция журнала «Патологическая физиология и экспериментальная терапия».