

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

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

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

ISSN 0031-2991
Патологическая физиология и экспериментальная терапия.
2013. №4. 1–128.

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

Тираж 300 экз.
© ООО «Гениус Медиа», 2013.

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

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

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

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

№4, 2013
ОКТАБРЬ—ДЕКАБРЬ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор Б.Б. Мороз

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

Редакционный совет

Ю.В. Балякин (Москва), Ю.Ю. Бяловский (Рязань),
В.Т. Долгих (Омск), А.М. Дыгай (Томск),
А.Я. Евтушенко (Кемерово), Д.А. Еникеев (Уфа),
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

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Хлебникова Н.Н., Крупина Н.А., Кушнарева Е.Ю.**
Уровень кортикоостерона в сыворотке крови крыс при экспериментальном моделировании депрессивноподобных состояний 3
- Цыган Н.В., Трашков А.П.**
Функциональное состояние головного мозга и возможности цитопротекции на модели острой церебральной гипоксии (экспериментальное исследование) 10
- Барсков И.В., Стельмашук Е.В., Романова Г.А., Хаспеков Л.Г.**
Морфологическое исследование нейропротекторных свойств дипептидного миметика фактора роста нервов (ГК-2h) при фокальном ишемическом повреждении префронтальной коры головного мозга крыс 17
- Тараканов И.А., Тихомирова Л.Н., Жукова А.Г., Сафонов В.А.**
Устойчивость нервной ткани ствола мозга к свободнорадикальному окислению у крыс при периодическом дыхании после введения оксипутирата 21
- Манухина Е.Б., Терехина О.Л., Белкина Л.М., Абрамочкин Д.В., Будапова О.П., Машина С.Ю., Смирин Б.В., Якунина Е.Б., Дауни Г.Ф.**
Вазопротекторный эффект адаптации к гипоксии при ишемическом и реперфузионном повреждении сердца 26
- Кравчук Е.Н., Гринева Е.Н., Галагудза М.М., Байрамов А.А.**
Влияние метформина на устойчивость миокарда к ишемии у крыс с неонатальным стрептозоточиным сахарным диабетом 2-го типа 32
- Лебедева М.А., Медведева Ю.С., Мирзоян Р.С., Маслеников Д.В., Золотов Н.Н., Карганов М.Ю.**
Интегральная оценка сдвигов в сывороточном гомеостазе при экспериментальном инфаркте миокарда 35
- Иванов А.В., Московцев А.А., Мартынова Е.А., Савина Г.Д., Лузянин Б.П., Кубатиев А.А.**
Общие аминокислоты плазмы крови крыс при внутрибрюшинном и подкожном введении гомоцистеина 41
- Ахмедов В.А., Долгих В.Т., Наумов Д.В., Нечипоренко Н.А.**
Участие матриксной металлопротеиназы-9 и тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы-1 в механизмах формирования пароксизмов фибрилляции предсердий у больных с метаболическим синдромом 46
- Карпова Р.В., Бочаров Е.В., Казеев И.В., Кучеряну В.Г., Бочарова О.А.**
Радиозащитная эффективность мультифитоадаптогена в опытах на собаках 51
- Порядин Г.В., Обрубов С.А., Богинская О.А., Пыков М.И., Ставицкая Г.В.**
Морфологические особенности сосудов иридоцилиарной системы после применения биопунктуры антигомотоксическим препаратом 55
- Назаров С.Б., Иванова А.С., Новиков А.А.**
Продукция оксида азота у беременных крыс и особенности постнатального системогенеза у их потомства, развивавшегося при нарушении маточно-плацентарного кровообращения 59
- Ордян Н.Э., Федотова Ю.О., Пивина С.Г., Акулова В.К.**
Влияние флуоксетина и пароксетина на тревожное поведение молодых и взрослых пренатально стрессированных самцов крыс 64

ОБЗОРЫ

- Вирюс Э.Д., Иванов А.В., Лузянин Б.П., Пальцын А.А., Кубатиев А.А.**
Масс-спектрометрия в биологии и медицине XXI века 68
- Аладинский В.А., Никифоров Н.Г., Орехова В.А., Мельниченко А.А., Карагодин В.П., Собенин И.А., Орехов А.Н.**
Прямая антиатеросклеротическая терапия: возможные подходы, результаты клинических исследований 76
- Акопов А.С., Московцев А.А., Доленко С.А., Савина Г.Д.**
Кластерный анализ в медико-биологических исследованиях 84
- Меситов М.В., Московцев А.А., Кубатиев А.А.**
Молекулярная логика сигнальных путей при стрессе эндоплазматического ретикулаума: система UPR (Unfolded Protein Response) 97

МЕТОДИКА

- Шойбонов Б.Б., Баронец В.Ю., Панченко Л.Ф., Кубатиев А.А.**
Экспресс-способ определения холестерина в иммунных комплексах 109
- Шойбонов Б.Б., Хайбулин В.Р., Баронец В.Ю., Панченко Л.Ф., Кубатиев А.А.**
Экспресс-оценка реактивности системы комплемента 115
- Котенко К.В., Мороз Б.Б., Насонова Т.А., Добрынина О.А., Липенгольц А.А., Гимадова Т.И., Дешевова Ю.Б., Лебедев В.Г., Лыршикова А.В., Еремин И.И.**
Экспериментальная модель тяжелых местных лучевых поражений кожи после действия рентгеновского излучения 121

ЮБИЛЕЙ

- Борис Борисович Мороз** (к 85-летию со дня рождения) 124
- Игорь Сергеевич Гушин** (к 75-летию со дня рождения) 126
- Николай Николаевич Петрищев** (к 75-летию со дня рождения) 127

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- Khlebnikova N.N., Krupina N.A., Kushnareva E.Yu.**
Blood serum corticosterone level in modeling depression-like states in rats
- Tsygan N.V., Trashkov A.P.**
Brain functional state and cytoprotective potential in model of acute cerebral hypoxia (experimental research)
- Barskov I.V., Stelmashuk E.V., Romanova G.A., Khaspekov L.G.**
Morphological study of neuroprotective properties of dipeptide mimetic of nerve growth factor (GK-2h) in focal ischemic damage of rat brain prefrontal cortex
- Tarakanov I.A., Tikhomirova L.N., Zhukova A.G., Safonov V.A.**
The resistance of low brainstem tissue to free radical oxidation in rats during periodic breathing following hydroxybutyrate treatment
- Manukhina E.B., Terekhina O.L., Belkina L.M., Abramochkin D.V., Budanova O.P., Mashina S.Yu., Smirin B.V., Yakunina E.B., Downey H.F.**
Vasoprotective effect of adaptation to hypoxia in myocardial ischemia and reperfusion injury
- Kravchuk E.N., Grineva E.N., Galagudza M.M., Bairamov A.A.**
The effect of metformin on myocardial tolerance to ischemia in rats with diabetes mellitus type 2
- Lebedeva M.A., Medvedeva U.S., Mirzoyan R.S., Maslennikov D.V., Zolotov N.N., Karganov M.Yu.**
Integrated assessment of serum homeostasis shifts in experimental myocardial infarction
- Ivanov A.V., Moskovtsev A.A., Martynova E.A., Savina G.D., Luzyanin B.P., Kubatiev A.A.**
Total aminothiols of rat plasma under intraperitoneal and subcutaneous introduction of homocysteine
- Akhmedov V.A., Dolgikh V.T., Naumov D.V., Nechiporenko N.A.**
The participation of matrix metalloproteinases-9 and TIMP-1 in formation of atrial fibrillation paroxysms in patients with metabolic syndrome
- Karpova R.V., Bocharov E.V., Kazeev I.V., Kucheryanu V.G., Bocharova O.A.**
Investigation of multiphytoadaptogene anti-radiation efficacy in dogs experiments
- Poradin G.V., Obrubov S.A., Boginskaya O.A., Pykov M.I., Stavitskaya G.V.**
Ultrastructural features of vascular iridociliary system after biopuncture by antihomotoxic medicine
- Nazarov S.B., Ivanova A.S., Novikov A.A.**
Nitric oxide production at pregnant rats and feature postnatal systemogenesis at their posterity developing at insufficiency of disturbance of utero-placental blood circulation
- Ordyan N.E., Pivina S.G., Fedotova Yu.O., Akulova V.K.**
Influence of fluoxetine and paroxetine on anxiety-like behavior in young and adult prenatally stressed male rats

REVIEWS

- Virus E.D., Ivanov A.V., Luzyanin B.P., Paltsyn A.A., Kubatiev A.A.**
Mass-spectrometry in biology and medicine of XXI Century
- Aladinsky V.A., Nikiforov N.G., Orekhova V.A., Melnichenko A.A., Karagodin V.P., Sobenin, I.A., Orekhov A.N.**
Direct antiatherosclerotic therapy: possible approaches, results of clinical trials
- Akopov A.S., Moskovtsev A.A., Dolenko S.A., Savina G.D.**
Cluster analysis in biomedical researches
- Mesitov M.V., Moskovtsev A.A., Kubatiev A.A.**
Molecular logic of the endoplasmic reticulum stress signal pathways: the system of Unfolded Protein Response

METHODS

- Shoibonov B.B., Baronets V.Yu., Panchenko L.F., Kubatiev A.A.**
A method of rapid determination of cholesterol in immune complexes
- Shoibonov B.B., Khajbulin V.R., Baronets V.Yu., Panchenko L.F., Kubatiev A.A.**
Rapid assessment of the complement system reactivity
- Kotenko K.V., Moroz B.B., Nasonova T.A., Dobrynya O.A., Lipengolts A.A., Gimadova T.I., Deshevo Yu.B., Lebedev V.G., Lyrshikova A.V., Eremin I.I.**
Experimental model of severe local radiation injuries of the skin after X-rays

ANNIVERSARY

- B.B. Moroz** (85 years)
- I.S. Guschin** (75 years)
- N.N. Petrishev** (75 years)

© Коллектив авторов, 2013
УДК 616-092

Н.Н. Хлебникова, Н.А. Крупина, Е.Ю. Кушнарева

Уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс при экспериментальном моделировании депрессивноподобных состояний

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

На двух моделях депрессивноподобного состояния — «поведенческого отчаяния» и экспериментального дофамин-дефицитзависимого МФТП-индуцированного депрессивного синдрома, — а также на модели тревожно-депрессивного состояния, вызываемого у взрослых крыс введением ингибитора дипептидилпептидазы-IV метионил-2(S)-цианопирролидина в раннем постнатальном периоде, симптомы депрессии поведения в тесте принудительного плавания сопровождались повышением уровня кортикостерона в сыворотке крови. Неконкурентный ингибитор пролилэндопептидазы (ПЭП) бензилоксикарбонил-метионил-2(S)-цианопирролидин на всех моделях проявлял свойства антидепрессанта, предотвращая развитие симптомов депрессии поведения. Ингибитор ПЭП также предотвращал повышение уровня кортикостерона в сыворотке крови крыс на моделях «поведенческого отчаяния» и тревожно-депрессивного состояния, но не на модели МФТП-индуцированного депрессивного синдрома. Полученные данные свидетельствуют о вовлеченности гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы в развитие депрессивной симптоматики на указанных моделях.

Ключевые слова: модели депрессивноподобных состояний, тест принудительного плавания, кортикостерон, ингибитор пролилэндопептидазы

N.N. Khlebnikova, N.A. Krupina, E.Yu. Kushnareva

Blood serum corticosterone level in modeling depression-like states in rats

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

In two models of depression-like state — «behavioral despair» and experimental dopamine deficit-dependent MPTP-induced depression-like syndrome — as well as in a model of anxiety-depression-like state induced by dipeptidyl peptidase IV inhibitor methionyl-2(s)-cyanopyrrolidine administered in early postnatal period, the symptoms of behavioral depression in rats in the forced swim test were accompanied by the increase of corticosterone level in blood serum. In every model non-competitive prolyl endopeptidase (PEP) inhibitor benzyloxycarbonyl-methionyl-2(S)-cyanopyrrolidine showed antidepressant-like properties preventing the development of depressive-like behavior. PEP Inhibitor also prevented the increase of serum corticosterone level in the models of «behavioral despair» and anxiety-depressive state, but not in the model of MPTP-induced depression-like syndrome. These findings testify for the involvement of hypothalamic-pituitary-adrenal system in the implementation of depression-like behavior in the specified models of depression-like state.

Key words: models of depression-like states, forced swim test, corticosterone, prolyl endopeptidase inhibitor

В современной биологической психиатрии одним из значимых факторов, приводящих к возникновению заболеваний депрессивного спектра, считаются физические и психоэмоциональные стрессы [13, 22]. Однако специфические нейробиологические механизмы влияния стресса на развитие депрессивной симптоматики до конца не выяснены. Согласно принятой в настоящее время теории, в патогенез аффективных расстройств вовлечены нервная, эндокрин-

ная и иммунная системы, которые находятся в тесном взаимодействии [2, 12].

По сложившемуся мнению, некоторые клинические проявления депрессий могут быть результатом патологического функционирования (гиперактивации) гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы (ГГАС). Примерно у половины больных с диагнозом большое депрессивное расстройство обнаружен повышенный уровень кортизола и АКТГ в плазме крови, увеличенный уровень кортиколиберина в ЦСЖ [24] и десенситизация ГГАС к сигналам отрицательной обратной связи, в основе которой лежит субчувствительность глюкортикоидных рецепторов [15].

Для корреспонденции: Хлебникова Надежда Николаевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: nanikh@yandex.ru

Изучение патогенеза нейроиммуноэндокринного взаимодействия при депрессии до настоящего времени является серьезной проблемой, решение которой связано с необходимостью разработки новых моделей депрессивных состояний, различных по способу индукции. Для исследования связи между стрессом, активностью ГАС и депрессивным поведением используют целый ряд экспериментальных моделей, в той или иной степени удовлетворяющих критериям адекватности клиническому прообразу [2, 18, 25].

Классической широко используемой моделью реактивной депрессии считается «поведенческое отчаяние», возникающее у грызунов в стрессогенной обстановке теста принудительного плавания [10, 11, 16, 19, 21]. «Поведенческое отчаяние» сопровождается увеличением уровня кортикостерона и АКТГ в плазме крови у грызунов [19, 23].

В наших исследованиях разработаны две оригинальные модели депрессии поведения: модель экспериментального дофаминдефицит-зависимого депрессивного синдрома у крыс, вызываемого двухнедельным введением пронеуротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) [6], и модель тревожно-депрессивного состояния у взрослых крыс, вызываемого ранним постнатальным двухнедельным введением ингибитора дипептидиллептидазы-VI (ДПП-IV) [4]. На этих моделях, а также на модели «поведенческого отчаяния» в тесте принудительного плавания по Порсолту ингибитор пролилэндопептидазы бензилоксикарбонил-метионил-2(S)-цианопирролидин проявлял свойства антидепрессанта [1, 3, 8]. Кроме того, на модели МФТП-индуцированного депрессивного синдрома этот ингибитор предотвращал изменение массы стресс-компетентных органов у крыс, что свидетельствовало о наличии у него антистрессорного действия [7]. Известно, что стрессирующие воздействия в раннем постнатальном периоде жизни могут иметь отсроченные последствия на поведенческом и нейроэндокринном уровнях [10]. Эти данные предполагают возможность активации стресс-опосредующих механизмов у крыс с тревожно-депрессивным состоянием, вызванным постнатальным введением ингибитора ДПП-IV, и с МФТП-индуцированным депрессивным синдромом. Мы предположили, что патогенез депрессивноподобного поведения животных на разработанных нами моделях включает нарушение функциональной активности ГАС.

Целью настоящего исследования было:

1) изучение вовлеченности ГАС в развитие депрессивноподобного поведения у крыс на моделях МФТП-индуцированного депрессивного синдрома и тревожно-депрессивного состояния, вызванного постнатальным введением ингибитора ДПП-IV в сравнении с эффектами активации ГАС на классической модели «поведенческого отчаяния»;

2) изучение влияния синтетического неконкурентного ингибитора ПЭП бензилоксикарбонил-метионил-2(S)-цианопирролидина на уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс с симптомами депрессии поведения на различных моделях депрессивноподобных состояний.

Материалы и методы

Опыты проведены на белых крысах-самцах популяции Вистар. Животные содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к пище и воде. 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.

В трех сериях экспериментов использовали различные модели депрессии поведения.

В первой серии *стресс-индуцированное депрессивноподобное состояние у крыс* вырабатывали в тесте принудительного плавания по классической методике Порсолта [21]. В первый день каждую крысу на 15 мин помещали в сосуд, заполненный водой (+24—25°C) до отметки на высоте 35 см. В течение первых 5 мин фиксировали длительность пассивного плавания, к которому относили периоды с минимальными движениями, необходимыми для поддержания тела на плаву, и периоды иммобильности, во время которых плавательные движения отсутствовали. Кроме того, оценивали число периодов активного плавания, во время которых животные работали всеми конечностями, пытаясь выбраться из сосуда. Через 24 ч крыс разделяли на три группы: первой группе (n=9) не вводили никаких препаратов (Модель, «М»), второй группе (n=9) за 30 мин до тестирования вводили физиологический раствор (ФР; «ФР+М»), третьей (n=9) — неконкурентный ингибитор ПЭП бензилоксикарбонил-метионил-2(S)-цианопирролидин (Z-Met-Prd-N, ИНГ; константа ингибирования ПЭП из подкорковых структур по субстрату Z-Ala-Pro-7-амино-4-кумариламиду составляет 4,4 нмоль/л, из коры — 1,4 нмоль/л; синтезирован в ФБГУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» РАМН) в дозе 1,0 мг/кг («ИНГ+М»). Все препараты вводили внутрибрюшинно (в/б) в объеме 1,0 мл/кг массы тела животного. Затем животных тестировали в ситуации неизбежного плавания в течение 5 мин.

Во второй серии *экспериментальный дофаминдефицитзависимый депрессивный синдром* моделировали путем системного введения животным пронеуротоксина МФТП (синтезирован в ФБГУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» РАМН), специфического в отношении DA-ергических нейронов [7]. Во время эксперимен-

та крыс содержали в клетках индивидуально, только на сухом корме. МФТП вводили животным в/б в дозе 20,0 мг/кг ежедневно в течение 14 дней. Контрольным крысам по той же схеме вводили ФР. Части подопытных и контрольных животных за 30 мин до инъекции МФТП или ФР вводили Z-Met-Prd-N в дозе 1,0 мг/кг, в/б: группы «ИНГ+МФТП» (n=8) и «ИНГ+ФР» (n=8). Остальным животным вводили ФР: группы «ФР+МФТП» (n=7) и «ФР+ФР» (n=7). Развитие симптомов депрессивного синдрома оценивали в батарее тестов [5], одним из которых был модифицированный 10-минутный однодневный тест принудительного плавания. В этом тесте длительность иммобильности характеризовали по коэффициенту иммобильности, определяемому как длительность иммобильности за 1 мин тестирования. Также определяли индекс депрессивности (ИД, отношение числа периодов иммобильности длительностью до 6 секунд к числу периодов активного плавания). Увеличение этих показателей характеризует развитие «поведенческого отчаяния» и биоритмологических нарушений у крыс соответственно.

В третьей серии тревожно-депрессивное состояние у взрослых крыс моделировали путем постнатального введения метионил-2(S)-цианопирролидина — неконкурентного синтетического ингибитора ДП-IV (синтезирован в ФГБУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» РАМН, константа ингибирования по субстрату Gly-Pro-7-амино-4-кумариламиду — 2,7 нмоль/л) [4]. Крысятам опытных групп (о) после рождения с 5-го по 18-й день включительно внутрибрюшинно вводили ингибитор в дозе 1,0 мг/кг в объеме 0,1 мл на 10 г массы тела. Контрольным животным (к) по той же схеме вводили ФР. В состав каждой группы входили детеныши из 3—4 пометов. В возрасте 1 мес. крысят отделяли от матери и изучали поведение животных в динамике взросления. В возрасте 2 мес. в тесте принудительного плавания оценивали депрессию поведения животных по показателям длительности иммобильности и величины ИД [3]. По результатам обследования были сформированы 3 группы крыс, каждая из которых состояла из двух подгрупп — опытной и контрольной, сформированных таким образом, чтобы в каждой группе длительность иммобильности и ИД у крыс опытной подгруппы статистически значимо превышали величину указанных показателей у крыс контрольной подгруппы. В течение 10 дней ежедневно животным одной группы вводили классический трициклический антидепрессант имипрамин как препарат сравнения (ИМИ, «EGIS», Венгрия; 10,0 мг/кг, в/б: «к-ИМИ», n=7; «о-ИМИ», n=6), животным второй группы — Z-Met-Prd-N (2,0 мг/кг, в/б: «к-ИНГ», n=8; «о-ИНГ», n=7), животным третьей группы — ФР: «к-ФР», n=8; «о-ФР», n=7). Повторное тестирование плавательно-

го поведения проводили через сутки после прекращения инъекций препаратов.

Интактным контролем для всех экспериментальных моделей депрессивноподобного поведения служили крысы, не подвергавшиеся введению каких-либо препаратов и не участвовавшие в поведенческих тестах (группа «ИНТ», n=14).

Забор крови осуществляли методом декапитации в 1-й и 3-й экспериментальной сериях через 30 мин после окончания плавательного теста, во 2-й серии — через сутки после последнего введения препаратов. Образцы сыворотки хранили при -20°C до момента измерения кортикостерона. Определение уровня кортикостерона проводили методом твердофазного иммуоферментного анализа с использованием диагностического набора EIA-4164 (DRG ELISA, США).

Статистическую обработку результатов проводили по алгоритмам программы «Statistica 7.0». Поскольку критерий Колмогорова—Смирнова отвергал гипотезу о нормальном характере распределения данных, для сравнения нескольких независимых выборок применяли непараметрический однофакторный дисперсионный анализ Краскелла—Уоллиса с последующим анализом по непарному непараметрическому U-критерию Манна—Уитни. Для внутригрупповых сравнений попарно связанных переменных использовали ранговый критерий Вилкоксона. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принималось равным 0,05. Если достигнутый уровень статистической значимости превышал критическое значение, принималась нулевая гипотеза. Данные представлены в виде $M \pm SEM$, где M — среднее, SEM — стандартная ошибка среднего.

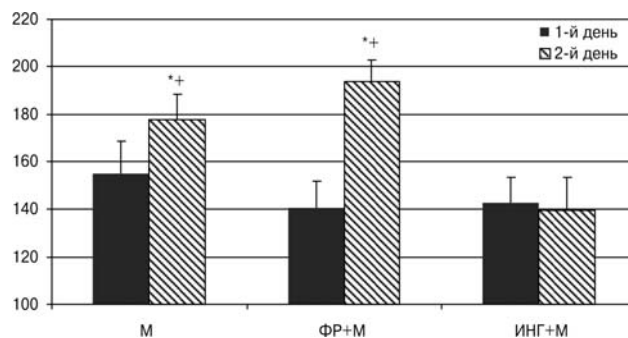


Рис. 1. Длительность плавания (с) при моделировании «поведенческого отчаяния» в классическом тесте принудительного плавания Порсолта.

Темные столбики (1 день) — день выработки «поведенческого отчаяния»; заштрихованные столбики (2 день) — день тестирования «поведенческого отчаяния».

Группы: «М» — модель, без введения препаратов; «ФР+М» — введение ФР за 30 мин до тестирования; «ИНГ+М» — введение ингибитора пролилэндопептидазы бензилоксикарбонил-метионил-2(S)-цианопирролидина за 30 мин до тестирования; «ИНТ» — интактные животные.

* — $p < 0,05$ по сравнению с предыдущим днем; + — $p < 0,05$ по сравнению с группой «ИНГ+М».

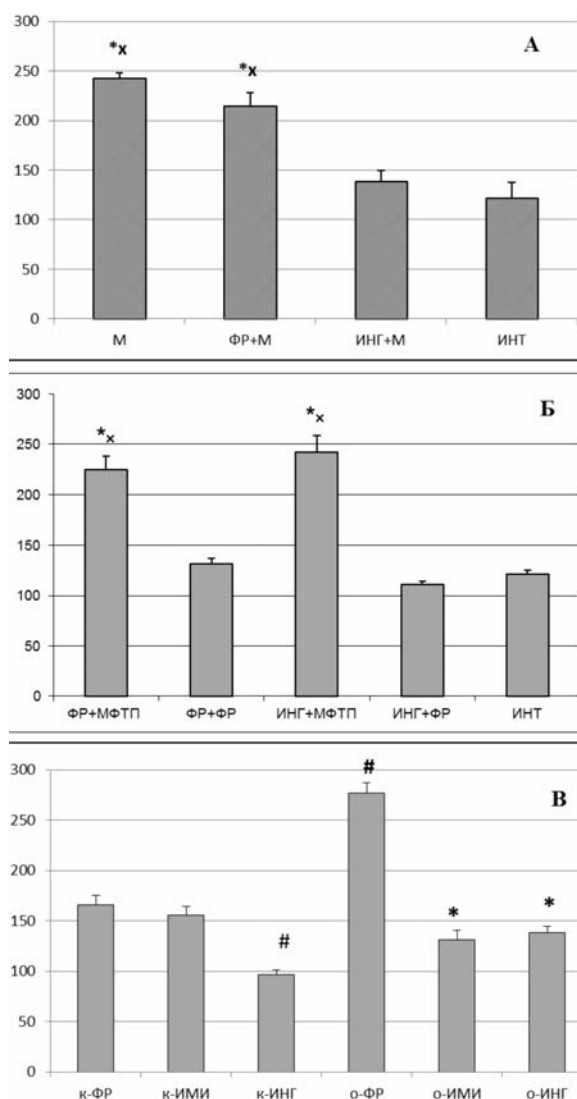


Рис. 2. Уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс (нг/мл).
 А. Модель «поведенческого отчаяния». Через 30 мин после окончания тестирования. Группы: «М» — модель, без введения препаратов; «FR+M» — введение FR за 30 мин до тестирования; «ING+M» — введение ингибитора пролилэндопептидазы бензилоксикарбонил-метионил-2(S)-цианопирролидина за 30 мин до тестирования; «ИНТ» — интактные животные. * — $p < 0,05$ по сравнению с группой «ING+M»; x — $p < 0,05$ по сравнению с группой «ИНТ».
 Б. Модель МФТП-индуцированного экспериментального депрессивного синдрома. Через сутки после последнего введения препаратов. Группы: «FR+MФТП» — введение FR за 30 мин до МФТП; «FR+ФР» — введение FR с интервалом 30 мин; «ING+MФТП» — введение ИНГ за 30 мин до МФТП; «ING+ФР» — введение ИНГ за 30 мин до FR; «ИНТ» — интактные животные. * — $p < 0,05$ по сравнению с группой «ING+MФТП»; x — $p < 0,05$ по сравнению с группой «ИНТ».
 В. Модель тревожно-депрессивного состояния, вызванного постнатальным введением ингибитора ДПП-IV метионил-2(S)-цианопирролидина. Через 30 мин после окончания тестирования. Подгруппы: к — введение FR в раннем постнатальном периоде; о — введение ингибитора DPP-IV метионил-2(S)-цианопирролидина в раннем постнатальном периоде; ФР — физиологический раствор; ИМИ — имипрамин; ИНГ — ингибитор пролилэндопептидазы бензилоксикарбонил-метионил-2(S)-цианопирролидин. # — $p < 0,05$ по сравнению с подгруппой «к-ФР»; * — $p < 0,05$ по сравнению с подгруппой «о-ФР».

Результаты и обсуждение

В первой серии в группе «М» и «М+ФР» наблюдали увеличение длительности пассивного плавания и уменьшение числа периодов активного плавания в день тестирования по сравнению с днем выработки депрессии поведения (рис. 1), что свидетельствовало о развитии у крыс так называемого «поведенческого отчаяния», которое можно рассматривать как модель стресс-реактивной депрессии [20]. Ингибитор ПЭП Z-Met-Prd-N предотвращал появление депрессивной симптоматики, и в день тестирования длительность пассивного плавания в группах «М» и «FR+M» была больше, чем в группе «ING+M» [$H(2, N = 27) = 6,038$, $p = 0,048$]. Выявлена тенденция к снижению числа периодов активного плавания в группах «FR+M» и «М» по сравнению с группой «ING+M» [$H(2, N = 27) = 5,322$, $p = 0,069$].

Уровень кортикостерона в группах «М» и «FR+M» был выше, чем у интактных животных и у животных с введением Z-Met-Prd-N (группа «ING+M») [$H(3, N = 37) = 18,258$, $p = 0,0004$; рис. 2А].

Во второй экспериментальной серии на стадии выраженной депрессии поведения статистически значимые различия между группами выявлены по показателям длительности иммобильности и ИД [$H(3, N = 31) = 7,823$, $p = 0,049$ и $H(3, N = 31) = 8,812$, $p = 0,032$ соответственно]. Значения этих показателей в группе «FR+MФТП» были выше, чем в контрольной группе «FR+ФР» и группе «ING+MФТП» (рис. 3). ИНГ сам по себе не влиял на поведение крыс в тесте принудительного плавания: различий между группами «FR+ФР» и «ING+ФР» не обнаружено. В группе «ING+MФТП» Z-Met-Prd-N предотвращал появление нарушений плавательного поведения у крыс. Длительность иммобильности и ИД в этой группе не отличались от контрольных значений и были снижены по сравнению с группой «FR+MФТП».

Уровень кортикостерона в крови у крыс с депрессивным синдромом в группе «FR+MФТП» был выше, чем у животных в группе «FR+ФР» и у интактных крыс ($H(4, N = 40) = 12,892$, $p = 0,012$; рис. 2Б). Z-Met-Prd-N не влиял на уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс. Значения этого показателя в группах «ING+ФР» и «ING+MФТП» не отличались от соответствующих контролей «FR+ФР» и «FR+MФТП». При этом уровень кортикостерона в группе «ING+MФТП» был значимо выше, чем в группе «ING+ФР».

В третьей серии экспериментов в тесте принудительного плавания субхроническое введение ИМИ или ИНГ не оказывало существенного влияния на

длительность иммобильности и ИД у крыс контрольных групп, а у крыс опытных групп приводило к снижению значений этих показателей по сравнению с предыдущим тестированием. В подгруппе «о-ИНГ» снижение было статистически значимым, в подгруппе «о-ИМИ» — на уровне выраженной тенденции (рис. 4 А,Б). Длительность иммобильности и ИД при повторном тестировании статистически значимо не отличались в подгруппах «к-ИМИ»/«о-ИМИ» и «к-ИНГ»/«о-ИНГ». В подгруппе «о-ФР» величины этих показателей оставались по-прежнему выше контрольных значений в подгруппе «к-ФР».

Уровень кортикостерона в подгруппе «о-ФР» был выше, чем в подгруппе «к-ФР»; в подгруппе «о-ИМИ» — ниже, чем в подгруппе «о-ФР»; в подгруппах «о-ИМИ» и «к-ИМИ», а также в подгруппах «к-ИНГ» и «о-ИНГ» уровень кортикостерона статистически значимо не различался (рис. 2В). На фоне действия ИНГ уровень кортикостерона в подгруппе «о-ИНГ» был ниже, чем в подгруппе «о-ФР», а в подгруппе «к-ИНГ» — ниже, чем в подгруппе «к-ФР». Уровень кортикостерона в подгруппе «ИНТ» был статистически значимо ниже только по сравнению с уровнем гормона в группе «о-ФР» (на рис. 2В данные по группе «ИНТ» не приведены).

Таким образом, на двух экспериментальных моделях депрессивноподобного состояния — «поведенческого отчаяния» и МФТП-индуцированного депрессивного синдрома — и модели тревожно-депрессивного состояния, вызванного вмешательством в развитие организма в раннем постнатальном периоде, различных по способу индукции нарушений поведения у крыс, симптомы депрессии поведения сопровождались повышением уровня кортикостерона в сыворотке крови крыс. Полученные данные прямо свидетельствуют о вовлеченности ГГАС в развитие этих психоэмоциональных нарушений.

Интересно отметить, что в классическом тесте Порсолта уровень кортикостерона в группе с введением ФР был выше, чем у интактных животных, в то время как на моделях МФТП-индуцированного депрессивного синдрома и тревожно-депрессивного расстройства уровень кортикостерона после плавательного теста у крыс контрольных групп, которым вводили ФР, не отличался от значений у интактных животных. Возможно, выявленные различия в эффектах ФР на разных моделях связаны с процедурой субхронического введения препаратов при моделировании указанных состояний. Острый стресс приводит к повышению секреции кортиколиберина в гипоталамусе, хронический — подавляет высвобождение кортиколиберина, что вызывает соответствующие изменения в уровне кортикостерона в крови [14].

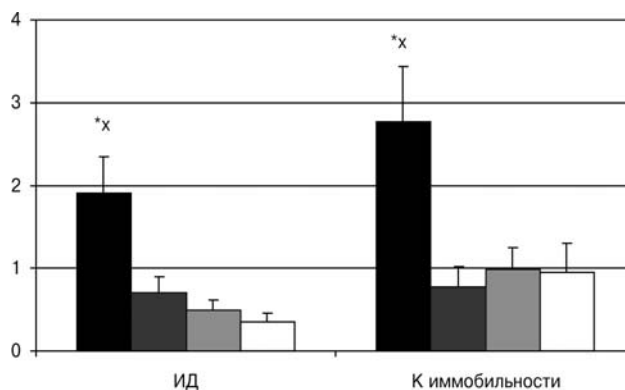


Рис. 3. Показатели плавательного поведения крыс при моделировании МФТП-индуцированного депрессивного синдрома в тесте принудительного плавания. Столбики: черный — группа «ФР+МФТП» (введение ФР за 30 мин до МФТП); темно-серый — группа «ФР+ФР» (введение ФР с интервалом 30 мин); светло-серый — группа «ИНГ+МФТП» (введение ИНГ за 30 мин до МФТП); белый — группа «ИНГ+ФР» (введение ИНГ за 30 мин до ФР). «ИНТ». $p < 0,05$ по сравнению с группой: * — «ФР+ФР»; x — «ИНГ+МФТП»

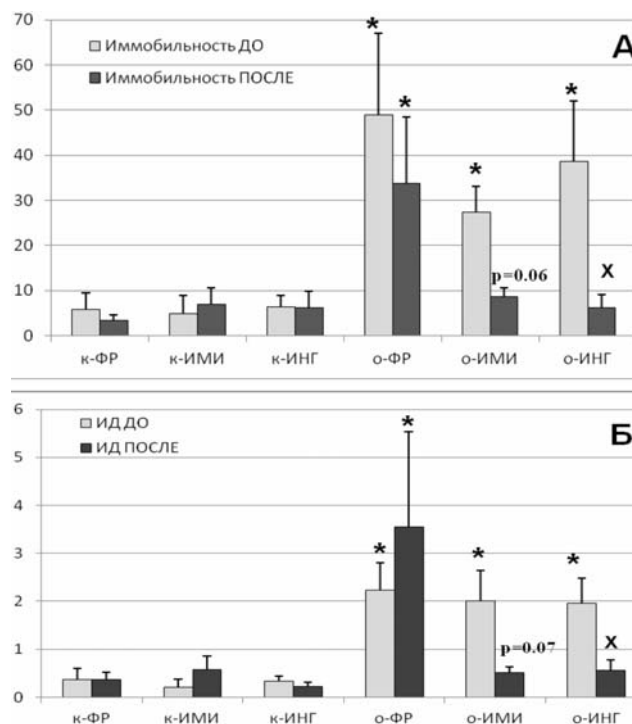


Рис. 4. Показатели плавательного поведения у крыс с тревожно-депрессивным состоянием, вызванным постнатальным введением ингибитора DPP-IV метионил-2(S)-цианопирролидина. А — длительность иммобильности (с); Б — индекс депрессивности (см. в методике). Серые столбики — через 2 мес. после введения ингибитора; темные столбики — после 10-дневного введения антидепрессантов. Подгруппы: к — введение ФР в раннем постнатальном периоде; о — введение ингибитора DPP-IV метионил-2(S)-цианопирролидина в раннем постнатальном периоде; ФР — физиологический раствор; ИМИ — имипрамин; ИНГ — ингибитор пролилэндопептидазы бензилоксикарбонил-метионил-2(S)-цианопирролидин. $p < 0,05$: * — по сравнению с соответствующим контролем; x — по сравнению с предыдущим измерением.

Антидепрессант ИМИ в условиях 10-дневного введения в дозе 10,0 мг/кг, в соответствии с ожидаемым эффектом, уменьшал поведенческие проявления депрессии [26], а также снижал уровень кортикостерона в крови на модели тревожно-депрессивного состояния, индуцированного постнатальным введением ингибитора ДПП-IV. Однако есть данные о том, что ИМИ в тесте принудительного плавания при двукратном введении крысам за 3 ч и 1 ч до тестирования в дозе 30 мг/кг уменьшал относительную длительность «флотирования» (фактически, суммарное время пассивного плавания и иммобильности) и снижал уровень АКТГ, но уровень кортикостерона оставался неизменным в конце тестирования [19]. Авторы работы рассматривают эти данные в контексте представлений о том, что секреция кортикостерона может осуществляться независимо от АКТГ [9], а для снижения уровня кортикостерона ИМИ должен применяться хронически, как это наблюдается в клинике. Полученные нами данные хорошо согласуются с этими представлениями.

В настоящем исследовании обнаружено, что антидепрессивное действие ингибитора ПЭП Z-Met-Prd-N сопровождается снижением повышенного уровня кортикостерона у подопытных крыс до контрольных значений на модели реактивной депрессии по Порсолту и у крыс с тревожно-депрессивным состоянием.

У крыс с МФТП-индуцированным депрессивным синдромом ингибитор ПЭП, напротив, не предотвращал повышение уровня кортикостерона, хотя нормализовал поведение крыс в тесте принудительного плавания. В наших исследованиях мы оценивали изменение только одного гормона стресса — кортикостерона. С учетом развивающихся представлений о том, что секреция кортикостерона может осуществляться независимо от АКТГ [9] и кортиколиберина [23], можно предположить наличие влияния Z-Met-Prd-N на другие мишени — тот же АКТГ, кортиколиберин или их рецепторы. Возможно, что в условиях двухнедельного введения пронеуротоксина МФТП, эффекты которого, как показано в наших исследованиях, включают не только депрессогенное, но и стрессогенное действие, вызывает стойкие пластические изменения в ЦНС, что сопровождается нарушением экспрессии генов стресс-гормонов, например, кортикостерона. В этом случае двухнедельный период действия препаратов со свойствами антидепрессанта может оказаться недостаточным для нормализации уровня кортикостерона и состояния ГГАС. В работе Данна и соавторов [11] приведены интересные свидетельства того, что активация ГГАС при хроническом стрессировании не обязательно находит свое отражение в развитии состояния «поведенческого отчаяния» в тесте принудительного плавания. Можно предполагать,

что антидепрессивное действие Z-Met-Prd-N на модели МФТП-индуцированного депрессивного синдрома не определяется его влиянием на уровень кортикостерона в крови.

Ответ на поставленные вопросы может быть найден в дальнейших исследованиях. В любом случае, полученные данные дают основание предполагать, что антидепрессивное действие Z-Met-Prd-N на некоторых моделях экспериментальных депрессивных состояний осуществляется путем влияния на регуляторные механизмы ГГАС.

Список литературы

1. **Крупина Н.А., Богданова Н.Г., Хлебникова Н.Н.** и др. Влияние ингибитора пролилэндопептидазы бензил-локсикарбонил- метионил- 2(s)-цианопирролидина на депрессивно-подобное поведение крыс в тесте принудительного плавания и активность пролинспецифических пептидаз в структурах мозга // Бюл. exper. биол. — 2012. — Т. 154, №11. — С. 559—563.
2. **Крупина Н.А., Давыдова Т.В., Хлебникова Н.Н.** и др. Аутоантитела к нейромедиаторам в динамике экспериментального депрессивно-подобного состояния у крыс // Патогенез. — 2012. — Т. 10, №3. — С. 22—25.
3. **Крупина Н.А., Кушарева Е.Ю., Хлебникова Н.Н.** и др. Поведенческие изменения у крыс, вызванные ингибитором дипептидилпептидазы IV метионил-2(S)-цианопирролидином: экспериментальная модель тревожно-депрессивного состояния // Бюл. exper. биол. — 2009. — Т. 147, №3. — С. 254—260.
4. **Крупина Н.А., Кушарева Е.Ю., Хлебникова Н.Н.** и др. Экспериментальная модель тревожно-депрессивного состояния у крыс, вызванная введением ингибитора дипептидилпептидазы IV метионил-2(S)-цианопирролидина в раннем постнатальном периоде // Журн. высш. нервн. деят. — 2009. — Т. 59, №3. — С. 360—372.
5. **Крупина Н.А., Орлова И.Н., Крыжановский Г.Н.** Метод интегральной оценки выраженности депрессии поведения у крыс // Журн. высш. нервн. деят. — 1999. — Т. 49. — Вып. 5. — С. 864—875.
6. **Крыжановский Г.Н., Крупина Н.А., Кучеряну В.Г.** Новая модель экспериментального депрессивного синдрома у крыс, вызванного системным введением живым 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) // Журн. высш. нервн. деят. — 1995. — Т. 45, №2. — С. 377—387.
7. **Хлебникова Н.Н., Крупина Н.А., Богданова Н.Г.** и др. Влияние ингибитора пролилэндопептидазы бензил-локсикарбонил- метионил-2(S)-цианопирролидина на развитие экспериментального депрессивного синдрома у крыс // Бюл. exper. биол. — 2009. — Т. 147, №1. — С. 27—31.
8. **Хлебникова Н.Н., Крупина Н.А., Богданова Н.Г.** и др. Влияние ингибитора пролилэндопептидазы бензил-локсикарбонил- метионил-2(S)-цианопирролидина на течение экспериментального депрессивного синдрома у крыс // Бюл. exper. биол. — 2013. — Т. 155, №2. — С. 151—155.
9. **Bornstein S.R., Engeland W.C., Ehrhart-Bornstein M., Herman J.P.** Dissociation of ACTH and glucocorticoids // Trends Endocrinol. Metab. — 2008. — Vol. 19. — P. 175—180.

10. **Darnaudery M., Maccari S.** Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress // *Brain. Res. Rev.* — 2008. — Vol. 57, №2. — P. 571—585.
11. **Dunn A.J., Swiergiel A.H.** Effects of Acute and Chronic Stressors and CRF in Rat and Mouse Tests for Depression // *Stress, Neurotransmitters, and Hormones: Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2008. — Vol. 1148. — P. 118—126.
12. **Irwin M.R.** Human psychoneuroimmunology: 20 years of discovery // *Brain Behav. Immun.* — 2008. — Vol. 22, №2. — P. 129—139.
13. **Kendler K.S., Gardner C.O.** Dependent stressful life events and prior depressive episodes in the prediction of major depression: the problem of causal inference in psychiatric epidemiology // *Arch. Gen. Psychiatry.* — 2010. — Vol. 67, №11. — P. 1120—1127.
14. **Lightman S.L.** The neuroendocrinology of stress: a never ending story // *J. Neuroendocrinol.* — 2008. — Vol. 20, №6. — P. 880—884.
15. **Maletic V., Robinson M., Oakes T.** et al. Neurobiology of depression: an integrated view of key findings // *Int. J. Clin. Pract.* — 2007. — Vol. 61, №12. — P. 2030—2040.
16. **Marks W., Fournier N.M., Kalynchuk L.E.** Repeated exposure to corticosterone increases depression-like behavior in two different versions of the forced swim test without altering nonspecific locomotor activity or muscle strength // *Physiol. Behav.* — 2009. — Vol. 98, №1—2. — P. 67—72.
17. **McEwen B.S.** Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain // *Metabolism.* — 2005. — Vol. 54. — P. 20—23.
18. **Newport D.J., Stowe Z.N., Nemeroff C.B.** Parental depression: animal models of an adverse life event // *Am. J. Psychiatry.* — 2002. — 159. — P. 1265—1283.
19. **Pinter O., Domokos A., Mergl Z.** et al. Do stress hormones connect environmental effects with behavior in the forced swim test? // *Endocr. J.* — 2011. — Vol. 58, №5. — P. 395—407.
20. **Piras G., Giorgi O., Corda M.G.** Effects of antidepressants on the performance in the forced swim test of two psychogenetically selected lines of rats that differ in coping strategies to aversive conditions // *Psychopharmacology (Berl.)*. — 2010. — Vol. 211, №4. — P. 403—414.
21. **Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., Jalfre M.** Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments // *Eur. J. Pharmacol.* — 1978. — Vol. 47, №4. — P. 379—391.
22. **Power R.A., Cohen-Woods S., Ng M.Y.** et al. Genome-wide association analysis accounting for environmental factors through propensity-score matching: application to stressful life events in major depressive disorder // *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* — 2013. — Vol. 162B, №6. — P. 521—529.
23. **Solich J., Palach P., Budziszewska B., Dziedzicka-Wasylewska M.** Effect of two behavioral tests on corticosterone level in plasma of mice lacking the noradrenaline transporter // *Pharmacological Reports.* — 2008. — Vol. 60. — P. 1008—1013.
24. **Southwick S.M., Vythilingam M., Charney D.S.** The psychobiology of depression and resilience to stress: implications for prevention and treatment // *Annu. Rev. Clin. Psychol.* — 2005. — Vol. 1. — P. 255—291.
25. **Sternner E.Y., Kalynchuk L.E.** Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: relevance to depression // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* — 2010. — Vol. 34, №5. — P. 777—790.
26. **Szymanska M., Budziszewska B., Jaworska-Feil L.** et al. The effect of antidepressant drugs on the HPA axis activity, glucocorticoid receptor level and FKBP51 concentration in prenatally stressed rats // *Psychoneuroendocrinology.* — 2009. — Vol. 34, №6. — P. 822—832.

Поступила 25.10.13

Сведения об авторах:

Крупина Наталья Александровна, д-р биол. наук, лаб. общей патологии нервной системы ФГБУ «НИИОПП» РАМН
 Кушнарева Екатерина Юрьевна, канд. мед. наук, лаб. общей патологии нервной системы ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Н.В. Цыган¹, А.П. Трашков²

Функциональное состояние головного мозга и возможности цитопротекции на модели острой церебральной гипоксии (экспериментальное исследование)

¹ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6

² Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2

Исследованы функциональное состояние головного мозга и возможности фармакологической цитопротекции после острой церебральной гипоксии. Работа выполнена на 186 самцах-альбиносах серых крыс. У животных экспериментальных групп выполняли острую тромбоэмболию в бассейне правой сонной артерии. Анализировали функциональное состояние головного мозга, а также эффективность и безопасность применения комплексного цитопротективного препарата цитофлавин в течение 10 сут. после тромбоэмболии. На 1-е, 3-и, 10-е сут. оценивали уровни биомаркеров нервной ткани в плазме крови (NSE, GFAP, S100β) и в цитоллизате головного мозга (NSE). Концентрация нейронспецифической енолазы повышалась в головном мозге на 1-е сут., в плазме крови — на 3-и сут. после тромбоэмболии, что может свидетельствовать об остром и отсроченном повреждении нейронов, а также о повышении проницаемости гематоэнцефалического барьера к 3-м сут. после острой тромбоэмболии в каротидном бассейне. Биомаркеры нейроглии в плазме крови повышались на 1-е (GFAP), 3-и и 10-е (S100β) сут. после тромбоэмболии, что характеризует острое и отсроченное повреждение клеток глии и/или ее активацию в ответ на повреждение нейронов. Таким образом, использованная экспериментальная модель сопровождается острым и отсроченным повреждением нейронов и нейроглии с ее возможной активацией. Применение цитофлавина оказывало цитопротективное влияние на нейроны, уменьшало степень повреждения и/или активации клеток глии в течение всего периода наблюдения после острой тромбоэмболии.

Ключевые слова: функциональное состояние головного мозга, острая церебральная гипоксия, биомаркеры нервной ткани, NSE, GFAP, S100β, цитопротекция, цитофлавин

N.V. Tsygan, A.P. Trashkov

Brain functional state and cytoprotective potential in model of acute cerebral hypoxia (experimental research)

¹ Russian Military Medical Academy

² Saint Petersburg State Pediatric Medical University

The functional state of the brain and the potential of pharmacologic cytoprotection after an acute cerebral hypoxia were studied. The experiment involved 186 adult male rats. The rats in experimental groups underwent acute thromboembolism of the right carotid artery. The functional state of the brain and the efficacy and safety of the Cytoflavin complex cytoprotective drug treatment had been analyzed over the 10 days following the thromboembolism. A neurological examination was accomplished daily, the serum levels of NSE, GFAP, S100β and brain cytolysate levels of NSE were measured on the 1st, 3rd, 10th day. The NSE brain cytolysate level went up on the 1st day and the NSE serum level was up on the 3rd day following the thromboembolism, which may have indicated an acute delayed alteration of neurons and an increase of the blood-brain barrier permeability on the 3rd day after the thromboembolism. Neuroglial biomarkers went up on the 1st (GFAP), 3rd and 10th (S100β) day, which indicated an acute delayed alteration and/or activation of glial cells. Therefore, the applied experimental model promotes acute delayed alteration of neurons and neuroglia with a possible activation of the latter. The Cytoflavin proved to have a cytoprotective effect on neurons and to diminish the alteration and/or activation of glial cells over the observed period after the acute thromboembolism of the carotid artery.

Key words: functional state of the brain, acute cerebral hypoxia, nerve tissue biomarkers, NSE, GFAP, S100β, cytoprotection, cytoflavin

Для корреспонденции: Цыган Николай Васильевич — канд. мед. наук, преподаватель кафедры нервных болезней ФГКБОУ ВПО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации. E-mail: 77th77@gmail.com

Острое изменение церебральной перфузии встречается в клинической и хирургической практике, в том числе при выполнении операций в условиях искусственного кровообращения. Этот способ поддержания системной и церебральной гемодинамики широко применяется при хирургическом лечении патологии сердца и грудной аорты, позволяет увеличить продолжительность операции и упростить выполнение ряда манипуляций [2, 15]. К основным факторам, влияющим на состояние головного мозга в условиях искусственного кровообращения, относят гипоперфузию и церебральную эмболию, к дополнительным — непulsирующий характер мозгового кровотока и нарушение его ауторегуляции, изменение проницаемости гематоэнцефалического барьера, артериовенозный дисбаланс, системные проявления воспаления, ишемическое и реперфузионное повреждение, генетическую предрасположенность [3, 4, 13, 16].

Очевидная трудность получения полной картины состояния нервной ткани в условиях искусственного кровообращения делает актуальной для экспериментальной медицины задачу создания и описания адекватной, патогенетически обоснованной модели гипоксического повреждения головного мозга — одного из важных осложнений искусственного кровообращения. С позиций изучения состояния нервной ткани преимуществами такой модели является возможность ее выполнения на лабораторных животных, небольшой объем выполняемых манипуляций и, как следствие, высокая воспроизводимость, а также возможность комплексной оценки изменений на любом этапе исследования. Выбор каротидного бассейна для моделирования нарушений церебральной гемодинамики обусловлен следующими отличиями от вертебрально-базиллярного бассейна: доступностью для манипуляций, меньшим риском гибели животного в остром периоде гипоперфузии нервной ткани, большим объемом кровоснабжаемой ткани и, соответственно, более высокой вероятностью выявления периперационных изменений.

В настоящее время для изучения состояния нервной ткани широко используют ряд биомаркеров, в том числе NSE (neuron specific enolase), белок GFAP (glial fibrillary acidic protein) и белок S100 β [9, 20, 31]. При этом экспериментальное изучение уровней маркеров нервной ткани в плазме крови, вероятно, обладает более высокой специфичностью, по сравнению с клиническими исследованиями, так как лабораторные животные не имеют сопутствующей соматической патологии, способной исказить результаты лабораторных анализов.

Для уменьшения гипоксического повреждения клеток и тканей широко используются комбинации инозина, янтарной кислоты, рибофлавина и никотина-

мида, которые входят в состав комплексного лекарственного препарата цитофлавин и улучшают энергетический обмен клетки на различных уровнях. Быстрое достижение антигипоксического, антиоксидантного и цитопротективного эффектов определяет его применение при кардиохирургических операциях для защиты сердца [5, 6] и головного мозга [14], в лечении черепно-мозговой травмы [1], острой и хронической ишемии головного мозга [7, 10, 12].

Цель исследования — изучение функционального состояния головного мозга и возможности фармакологической цитопротекции после острой церебральной гипоксии в эксперименте.

Методика

Исследование проведено на 186 самцах-альбиносах серых крыс массой тела 215—230 г, полученных в ФГУП ПЛЖ «Рапполово» РАМН (Ленинградская область). Перед проведением исследования все крысы в течение 14 сут. содержались в карантинном блоке вивария для исключения из эксперимента животных с соматической и инфекционной патологией.

Моделирование острой тромбоэмболии производили путем введения 0,3 мл 75% взвеси тромба в физиологическом растворе в правую сонную артерию. Тромб получали из крови крысы-донора. Цельную кровь без стабилизаторов оставляли на 40 мин в стеклянной пробирке. Образовавшийся тромб подвергали гомогенизированию и смешивали с физиологическим раствором. Под общим зоветиловым наркозом производили обнажение сонной артерии, мобилизовали ее и устанавливали катетер, через который вводили тромботические массы со скоростью 1,0 мл в мин. После этого производили перевязку сонной артерии и послойно ушивали рану.

Крысы были разделены на четыре группы путем рандомизации:

1. «Контроль» (n = 20) — интактные животные, у которых определяли показатели состояния нервной системы («норма»);

2. «Операция» (n = 16) — животные, которым выполняли катетеризацию правой сонной артерии с последующей перевязкой последней, без введения тромботической массы;

3. «Тромбоэмболия» (n = 75) — оперированные животные, которым производили интраартериальное введение тромботической массы;

4. «Лечение» (n = 75) — оперированные животные, которым производили интраартериальное введение тромботической массы. В течение 10 сут. от момента искусственной тромбоэмболии проводили терапию цитофлавином (ООО «НТФФ ПОЛИСАН», Россия). Раствор цитофлавина (0,2 мл цитофлавина

+ 0,1 мл 0,9%-ного раствора натрия хлорида) вводили ежедневно однократно в объеме 0,3 мл внутривенно в хвостовые вены крыс при помощи инфузионного насоса со скоростью 0,5 мл в мин.

Интенсивность структурно-функциональных нарушений работы нервной системы оценивали путем неврологического обследования животных и определения содержания биомаркеров нервной ткани в плазме крови и в цитолизате головного мозга крыс.

Неврологическое обследование интактных крыс проводили в день включения в исследование, в других группах его выполняли непосредственно перед манипуляциями и в последующем ежедневно до выведения из эксперимента. Неврологическое обследование не выполняли животным, находившимся в агональном состоянии, и при адинамии. Объем обследования включал оценку тонуса хвоста, туловищной атаксии при движении по горизонтальной плоскости, отставания конечностей при движении по горизонтальной плоскости, противодействия при поочередном разгибании конечностей. Каждый параметр оценивался по трехбалльной шкале:

- тонус хвоста: не изменен (2), снижен (1), атония (0);
- туловищная атаксия при движении по горизонтальной плоскости: отсутствует (2), умеренная (1), значительная (0);
- отставание левых или правых конечностей при движении по горизонтальной плоскости: отсутствует в обеих конечностях (2), умеренное в одной или двух конечностях (1), выраженное в одной или двух конечностях (0);
- противодействие при поочередном разгибании конечностей: сохранено в обеих конечностях (2), умеренно снижено в одной или двух конечностях (1), значительно снижено в одной или двух конечностях (0).

Взятие крови у животных производили путем транскутанной пункции сердца под эфирным наркозом в вакуумные системы Monovette (Sarstedt, Германия) с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Кровь центрифугировали, полученную плазму переносили в криопробирки и хранили при температуре -20°C до проведения исследования.

После процедуры взятия крови животных подвергали эвтаназии путем дополнительной ингаляции паров эфира. Взятие образцов тканей головного мозга производили немедленно после эвтаназии и подвергали их обработке по методике для подготовки к иммуноферментному анализу [17]. Взятие биологического материала у крыс в группах «тромбоэмболия» и «лечение» осуществляли на 1-е ($n = 15$), 3-и ($n = 15$) и 10-е ($n = 15$) сут. после окклюзии в бассейне сонной

артерии, у животных групп «контроль» и «операция» — на 10-е сут. эксперимента.

Оценку содержания биомаркеров нервной ткани — NSE, GFAP, S100 β — в плазме крови и цитолизате тканей мозга осуществляли иммуноферментным методом при помощи коммерческих наборов в соответствии с инструкцией фирмы-производителя (Cusabio, Китай).

Статистический анализ результатов обследования проводили в математико-статистическом пакете Stat-Soft Statistica v.10. Случайные величины описывали с помощью медианы и квартилей, при оценке долей рассчитывали доверительный интервал (ДИ) для параметра биномиального распределения. Для статистического анализа использовали непараметрический критерий Mann—Whitney, критерий Pearson Chi-square (при его неустойчивости использовался двусторонний Fisher exact test), коэффициент ранговой корреляции Kendall Tau, непараметрический односторонний дисперсионный анализ Kruskal—Wallis ANOVA by ranks, многофакторный дисперсионный анализ Factorial ANOVA. Достоверным уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Хирургические манипуляции на магистральной артерии шеи, тромбоэмболия и острая окклюзия в бассейне сонной артерии приводят к повреждению головного мозга животных. Следствием этого является высокий показатель летальности крыс в группах «тромбоэмболия» и «лечение», что отражает напряженность используемой модели острого повреждения головного мозга (табл. 1).

Статистически значимых отличий по уровню летальности между группами «тромбоэмболия» и «лечение» не было выявлено в течение всего времени проведения эксперимента, что свидетельствует о безопасности и хорошей переносимости цитофлавина.

Неврологическое обследование животных продемонстрировало очаговую неврологическую симптоматику у крыс в экспериментальных группах (табл. 2).

Результаты неврологического тестирования, наряду с анализом уровня летальности в экспериментальных группах, подтверждает обоснованность выбора и напряженность использованной модели поражения головного мозга. Качество выполнения эксперимента дополнительно зафиксировано отсутствием признаков нарушений функций нервной системы у крыс группы «контроль». Анализ уровня летальности и результатов неврологического обследования свидетельствуют о связи хирургических манипуляций и прекращения кровотока по сонной артерии в начале эксперимента с развитием преходящей мозговой дисфункции, значительно отягощаемой искусственной тромбоэмболией.

Таблица 1

Летальность крыс с острой окклюзией в бассейне сонной артерии

Период наблюдений		Группы животных			
		Контроль (N=20)	Операция (N=16)	Тромбоэмболия (N=75)	Лечение (N=75)
1 час	n; %; 95% [ДИ]	—	3; 18,8; [4,1-45,7]	17; 22,7; [13,8-33,8]	16; 21,3; [12,7-32,3]
1 сут.	n; %; 95% [ДИ]	—	1; 6,3; [0,2-30,2]	12; 16,0; [8,6-26,3]	12; 16,0; [8,6-26,3]
>1 сут.	n; %; 95% [ДИ]	—	—	1; 1,3; [0,0-7,2]	2; 2,7; [0,3-9,3]
0-10 сут.	n; %; 95% [ДИ]	—	4; 25,0; [7,3-52,4]	30; 40,0; [28,9-52,0]	30; 40,0; [28,9-52,0]

Примечание. N — общее количество животных в группе; n — количество погибших животных в группе; % — доля погибших животных в группе, %; 95% [ДИ] — доверительный интервал 95%.

Таблица 2

Результаты неврологического обследования крыс экспериментальных групп на 1—10 сут. после острой тромбоэмболии в каротидном бассейне

Группы животных		Количество животных с признаками нарушения функций нервной системы в течение периода наблюдения			
		Снижение тонуса хвоста	Туловищная атаксия	Отставание левых конечностей	Нарушение противодействия разгибанию левых конечностей
"Операция" (N=12)	n; %; 95% [ДИ]	8; 66,6; [34,9-90,1]	3; 25; [5,4-57,2]	3; 25; [5,4-57,2]	8; 66,6; [34,9-90,1]
"Тромбоэмболия" (N=46)	n; %; 95% [ДИ]	40; 87; [73,7-95,1]	38; 82,6; [68,6-92,2]	36; 78,3; [63,6-89,1]	42; 91,3; [79,2-97,6]
"Лечение" (N=47)	n; %; 95% [ДИ]	37; 78,7; [64,3-89,3]	34; 72,3; [57,4-84,4]	38; 80,9; [66,7-90,9]	41; 87,2; [74,3-95,2]

Примечание. N — общее количество животных в группе; n — количество животных с признаками нарушения функций нервной системы в группе; % — доля животных с признаками нарушения функций нервной системы в группе, %; 95% [ДИ] — доверительный интервал 95%

Существенных различий результатов неврологического тестирования в группах «тромбоэмболия» и «лечение» выявлено не было.

Результаты лабораторных исследований содержания биомаркеров нервной ткани представлены на рис. 1—4.

Результаты оценки уровней биомаркеров нервной ткани интерпретировали с учетом данных литературы. Нейронспецифическая енолаза экспрессируется преимущественно зрелыми нейронами и нейроэндокринными клетками, ее уровень повышается при повреждении нервных клеток [18, 20, 22, 26]. GFAP образует промежуточные филаменты в клетках глиального происхождения, прежде всего в астроцитах [29], однако также экспрессируется эпендимоцитами [28], клетками почек [21], кератиоцитами [33], остеоцитами и хондроцитами [24]. Повышение экспрессии GFAP отражает активацию астроцитов [25, 31], которая обычно сопровождается синтезом различных факторов роста нервной ткани, обеспечивающих сохранение нейронов [8]. Важно отметить, что быстрая и интенсивная гиперэкспрессия GFAP инициирует и усиливает воспаление, приводящее к гибели нейронов [19, 32]. S100β экспрессируется и секретируется в основном астроцитами и леммоцитами, присутствует в созревающих олигодендроцитах, предшественниках нейронов, а также в клетках вне нервной ткани [9].

Его внеклеточная концентрация может повышаться при активации, повреждении или гибели астроцитов [23, 25, 27]. После черепно-мозговой травмы GFAP и S100β экспрессируются астроцитами, нейронспецифическая енолаза — нейронами, что сопровождается повышением их уровней в плазме крови [25, 31].

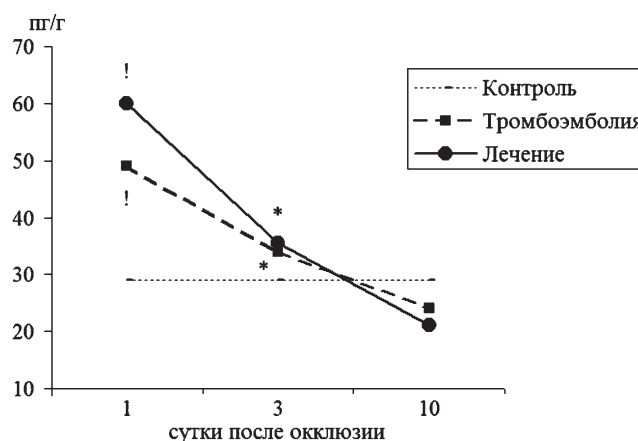


Рис. 1. Динамика концентрации NSE в цитозоле головного мозга (на рисунке отражены медианы; референсные значения — 29,0 [21,0; 39,5] пг/г). Достоверные отличия: ! — от контрольной группы; * — от предыдущего значения внутри группы; ** — группы «тромбоэмболия» от группы «лечение».

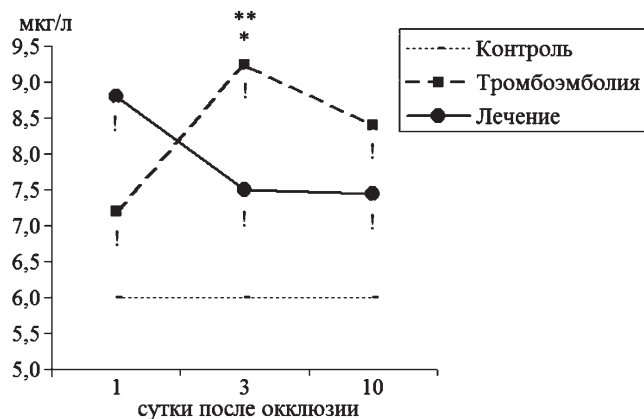


Рис. 2. Динамика концентрации NSE в плазме крови (на рисунке отражены медианы; референсные значения – 6,0 [5,65; 6,6] мкг/л). Достоверные отличия: ! – от контрольной группы; * – от предыдущего значения внутри группы; ** – группы «тромбоэмболия» от группы «лечение».

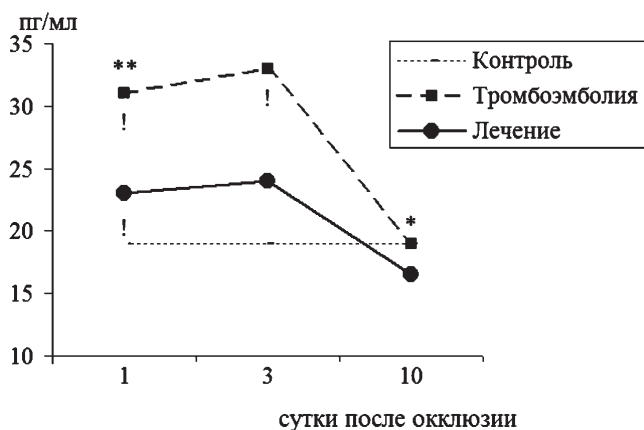


Рис. 3. Динамика концентрации GFAP в плазме крови (на рисунке отражены медианы; референсные значения – 19,0 [14,5; 22,0] пг/мл). Достоверные отличия: ! – от контрольной группы; * – от предыдущего значения внутри группы; ** – группы «тромбоэмболия» от группы «лечение».

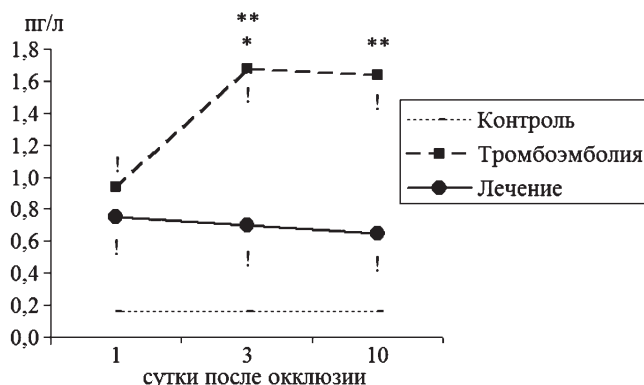


Рис. 4. Динамика концентрации S100β в плазме крови (на рисунке отражены медианы; референсные значения – 0,16 [0,12; 0,18] пг/л). Достоверные отличия: ! – от контрольной группы; * – от предыдущего значения внутри группы; ** – группы «тромбоэмболия» от группы «лечение».

В качестве референсных значений использовали показатели группы «контроль», сопоставимые с данными экспериментальных (в крови: NSE ~1,7 мкг/л, GFAP ~80 пг/мл, S100β ~0,4 пг/л) [30, 31] и клинических [11] исследований.

Хирургические манипуляции на правой сонной артерии с ее последующей перевязкой не оказывают влияние на уровни оцениваемых биомаркеров на 10-е сут. исследования, что подтверждает отсутствие значимых изменений функционального состояния головного мозга у крыс группы «операция».

Динамика уровня NSE в цитозинате головного мозга свидетельствует о его повышении только в первые сутки после тромбоэмболии в каротидном бассейне. В то время как достоверное превышение референсных значений концентрации NSE в плазме крови было достигнуто лишь на 3-и сут. и только в группе «тромбоэмболия». Это может характеризовать как острое, так и отсроченное повреждение нейронов, а также уменьшение тяжести отсроченного повреждения при лечении цитофлавином. Различия динамики NSE в цитозинате головного мозга и в плазме крови (рис. 1, 2) могут свидетельствовать о повышении проницаемости гематоэнцефалического барьера к 3-м сут. после каротидной окклюзии.

Повышение содержания GFAP в плазме крови на 1-е сут. после нарушения перфузии в каротидном бассейне оказалось значимым в группе крыс «тромбоэмболия» как по отношению к референсным значениям, так и в сравнении с группой «лечение». Аналогичная картина получена при анализе уровня s100β в плазме крови животных этой группы на 3-и и 10-е сут. после тромбоэмболии. Полученные данные позволяют предположить, что нарушение перфузии в каротидном бассейне сопровождается острой и отсроченной активацией клеток глии либо вследствие прямого повреждения, либо в ответ на повреждение нейронов. Различия в динамике биомаркеров могут быть связаны с различной вовлеченностью клеток нейроглии в патологический процесс: GFAP отражает состояние астроцитов [25], а S100β — преимущественно астроцитов, но также и других клеток нейроглии, включая олигодендроциты [9].

Достоверные различия между группами «тромбоэмболия» и «лечение» демонстрируют более низкий уровень биомаркеров повреждения нейронов и клеток глии в присутствии лекарственного препарата, что может указывать на мультимодальный цитопротективный эффект цитофлавина при острой каротидной окклюзии (рис. 1—4).

Статистический анализ результатов исследования показал сильную корреляционную связь ($\tau = 0,67$; $\rho < 0,001$) между сывороточными уровнями NSE и S100β, слабые корреляционные связи между уровня-

ми NSE в цитоллизате головного мозга и S100 β в плазме крови ($\tau = 0,17$; $\rho = 0,012$), NSE в цитоллизате головного мозга и GFAP в плазме крови ($\tau = 0,16$; $\rho = 0,018$), сывороточными уровнями GFAP и S100 β ($\tau = 0,17$; $\rho = 0,008$), что подтверждает повреждающее воздействие на нейроны, а также повреждение и/или реактивные изменения клеток глии. Слабая сила корреляционной связи между уровнями NSE в плазме крови и в цитоллизате головного мозга ($\tau = 0,21$; $\rho = 0,002$) может быть обусловлена относительной сохранностью функций гематоэнцефалического барьера.

Односторонний дисперсионный анализ продемонстрировал выраженную статистически достоверную взаимосвязь комплексного фактора (манипуляций, длительности патологического процесса, проводимого лечения) с динамикой исследуемых биомаркеров в плазме крови и в цитоллизате головного мозга ($\rho < 0,001$), что подтверждает возможность оценки состояния нервной ткани с применением использованных лабораторных показателей.

Многофакторный дисперсионный анализ показал достоверное влияние времени (14,2%, SS = 1211, $\rho < 0,002$) на динамику уровня GFAP в плазме крови (влияние лечения — 6,1%, SS = 524, $\rho = 0,018$; ошибка — 79%, SS = 6694), что подтверждает острый характер повреждения и/или активации нейроглии при нарушении церебральной перфузии (рис. 3).

Применение цитофлавина в качестве инфузионного метаболического средства, призванного уменьшить последствия острой гипоксии головного мозга, существенно снизило сывороточные уровни маркеров дисфункции нервной ткани в группе «лечение» по сравнению с показателями крыс группы «тромбоэмболия» (рис. 1—4). Показано, что применение цитофлавина оказало статистически значимое влияние на динамику уровня S100 β в плазме крови (30,7%, SS = 6,82, $\rho < 0,001$), связанное с длительностью лечения (влияние времени и лечения 11,4%, SS = 2,53, $\rho < 0,002$; влияние времени недостоверно ($\rho = 0,30$), ошибка — 56%, SS = 12,4), что напрямую свидетельствует о наличии нейропротективного эффекта цитофлавина на всех оцененных этапах после острой тромбоэмболии в каротидном бассейне.

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют об информативности используемой модели острой тромбоэмболии в каротидном бассейне у крыс для изучения функционального состояния головного мозга при остром изменении церебральной перфузии. Модель характеризуется острым и отсроченным повреждением нейронов, а также острым и отсроченным повреждением и/или активацией нейроглии, что подтверждается результатами неврологи-

ческого осмотра и лабораторной диагностики. Анализ сывороточных уровней нейронспецифической енолазы, белков S100 β и GFAP достаточно точно позволяют оценить степень повреждения нейронов и клеток глии. Однако оценка этих биомаркеров в крови (на примере нейронспецифической енолазы) не продемонстрировала сильную корреляцию с динамикой их уровней в тканях головного мозга крыс, что может объясняться относительной сохранностью функций гематоэнцефалического барьера. Применение комплексного антигипоксического препарата цитофлавина для лечения последствий острой тромбоэмболии в каротидном бассейне оказало мультимодальное цитопротективное влияние — как на нейроны, так и на клетки глии — в течение всего периода наблюдения.

Список литературы

1. *Белкин А.А., Кондратьев А.Н., Царенко С.В.* и др. Медицинская помощь при тяжелой черепно-мозговой травме на догоспитальном этапе // *Скорая мед. помощь.* — 2009. — №4. — С. 4—12.
2. *Бокерия Л.А., Аракелян В.С.* Хирургия аневризм грудного и торакоабдоминального отделов аорты: руководство для врачей. — М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, 2010. — 394 с.
3. *Бокерия Л.А., Камчатнов П.Р., Ключников И.В.* и др. Цереброваскулярные расстройства у больных с коронарным шунтированием // *Журн. неврологии и психиатрии.* — 2008. — №3. — С. 90—94.
4. *Вознюк И.А., Арсенова Н.А., Хубулава Г.Г.* Церебральные осложнения при коронарном шунтировании // *Медлайн.* — 2009. — Т. 10. — С. 150—159.
5. *Надирадзе З.З., Бахарева Ю.А., Каретников И.А.* Цитофлавин как дополнительный метод защиты миокарда при операциях с искусственным кровообращением // *Общ. реанимат.* — 2006. — Т. 2, №3. — С. 28—32.
6. *Оболенский С.В., Николаев А.А., Аббясов И.Г., Сливин О.А.* Интраоперационная защита миокарда в коронарной хирургии на работающем сердце // *Вестн. Санкт-Петербурга. Гос. мед. акад.* — 2003. — №4. — С. 1114—1117.
7. *Одинак М.М., Скворцова В.И., Вознюк И.А.* и др. Оценка эффективности цитофлавина у больных в остром периоде ишемического инсульта // *Журн. неврологии и психиатрии.* — 2010. — №12. — С. 29—36.
8. *Одинак М.М., Цыган Н.В.* Факторы роста нервной ткани в центральной нервной системе. — СПб.: Наука, 2005. — 157 с.
9. *Одинак М.М., Цыган Н.В., Иванов А.М.* и др. Белок S100 β — биомаркер повреждения головного мозга // *Вестн. Рос. Воен.-мед. акад.* — 2011. — №1. — С. 210—214.
10. *Пиравов М.А., Гулевская Т.С., Гнедовская Е.В.* и др. Синдром полиорганной недостаточности при тяжелых формах инсульта: клинко-морфологическое исследование // *Невр. Журн.* — 2006. — Т. 11, №5. — С. 9—13.
11. *Рогаткин С.О., Володин Н.Н., Дегтярева М.Г.* и др. Современные подходы к церебропротекторной терапии недоношенных новорожденных в условиях отделения реанимации и интенсивной терапии // *Журнал неврологии и психиатрии.* — 2011. — №1. — С. 27—32.

12. *Румянцева С.А., Силина Е.В.* Энергокоррекция и качество жизни при хронической ишемии мозга. — М.: Медицинская книга, 2007. — 60 с.
13. *Светлова Н.Ю.* Патфизиология повреждения мозга при операциях с искусственным кровообращением // Анест. и реаним. — 2006. — №3. — С. 24—27.
14. *Суслина З.А., Бокерия Л.А., Пирадов М.А.* и др. Цитофлавин — как средство профилактики поражений мозга в кардиохирургии // Профилактическая и клиническая медицина. — 2010. — №1. — С. 69—74.
15. *Хубулава Г.Г., Белевитин А.Б., Шихвердиев Н.Н.* и др. Хирургическое лечение заболеваний грудной аорты // Мед. акад. журн. — 2010. — №3. — С. 45—51.
16. *Шевченко Ю.Л., Одинак М.М., Кузнецов А.Н., Ерофеев А.А.* Кардиогенный и ангиогенный церебральный инсульт (физиологические механизмы и клинические проявления). — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. — 272 с.
17. *Щербаков А.М.* и др. Фактор роста эндотелия сосудов, его рецепторы и антиапоптотические белки BCL-2 и АКТ при раке молочной железы // Опухоли женской репродуктивной системы. — 2006. — №3. — С. 63—68.
18. *Barone F.C., Clark R.K., Price W.J.* et al. Neuron-specific enolase increases in cerebral and systemic circulation following focal ischemia // Brain Res. — 1993. — Vol. 623. — P. 77—82.
19. *Brahmachari S., Fung Y.K., Pahan K.* Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide // J. Neurosci. — 2006. — Vol. 26, №18. — P. 4930—4939.
20. *Butterworth R.J., Wassif W.S., Sherwood R.A.* et al. Serum neuron-specific enolase, carnosinase, and their ratio in acute stroke // Stroke. — 1996. — Vol. 27. — P. 2064—2068.
21. *Buniatian G., Traub P., Albinus M.* et al. The immunoreactivity of glial fibrillary acidic protein in mesangial cells and podocytes of the glomeruli of rat kidney in vivo and in culture // Biol. Cell. — 1998. — Vol. 90, №1. — P. 53—61.
22. *Cunningham R.T., Watt M., Winder J.* et al. Serum neuron-specific enolase as an indicator of stroke volume // Eur. J. Clin. Invest. — 1996. — Vol. 26. — P. 298—303.
23. *Donato R., Sorci G., Riuzzi F.* et al. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal // Biochim. Biophys. Acta. — 2009. — Vol. 1793, №6. — P. 1008—1022.
24. *Kasantikul V., Shuangshoti S.* Positivity to glial fibrillary acidic protein in bone, cartilage, and chordoma // J. Surg. Oncol. — 1989. — Vol. 41, №1. — P. 22—26.
25. *Kwon S.K.C., Kovessdi E., Gyorgy A.B.* et al. Stress and traumatic brain injury: a behavioral, proteomics, and histological study // Frontiers in neurology. — 2011. — Vol. 2, Art. 12. — P. 1—14.
26. *Marangos P.J.* Neuron specific enolase: a clinically useful marker of neurons and neuroendocrine cells // Annu. Rev. Neurosci. — 1987. — Vol. 10. — P. 269—295.
27. *Ostendorp T., Leclerc E., Galichet A.* Structural and functional insights into RAGE activation by multimeric S100B // EMBO J. — 2007. — Vol. 26, №16. — P. 3868—3878.
28. *Roessmann U., Velasco M.E., Sindely S.D., Gambetti P.* Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in ependymal cells during development. An immunocytochemical study // Brain Res. — 1980. — Vol. 200, №1. — P. 13—21.
29. *Schachner M., Hedley-White E.T., Hsu D.W.* et al. Ultrastructural localization of glial fibrillary acidic protein in mouse cerebellum by immunoperoxidase labeling // J. Cell Biol. — 1997. — Vol. 75. — P. 67—73.
30. *Shahsavand S., Mohammadpour A.H., Rezaee R.* et al. Effect of Erythropoietin on Serum Brain-Derived Biomarkers after Carbon Monoxide Poisoning in Rats // Iran. J. Basic Med. Sci. — 2012. — Vol. 15, №2. — P. 752—758.
31. *Svetlov S.I., Prima V., Glushakova O.* et al. Neuro-glial and systemic mechanisms of pathological responses in rat models of primary blast overpressure compared to «composite» blast // Frontiers in neurology. — 2012. — Vol. 3, Art. 15. — P. 1—12.
32. *Tani M., Glabinski A.R., Tuohy V.K.* et al. In situ hybridization analysis of glial fibrillary acidic protein mRNA reveals evidence of biphasic astrocyte activation during acute experimental autoimmune encephalomyelitis // Am. J. Pathol. — 1996. — Vol. 148, №3. — P. 889—896.
33. *Von Koskull H.* Rapid identification of glial cells in human amniotic fluid with indirect immunofluorescence // Acta Cytol. — 1984. — Vol. 28, №4. — P. 393—400.

Поступила 11.06.13

Сведения об авторах:

Трашков Александр Петрович, канд. мед. наук, доцент, зав. лабораторией экспериментальной медицины, НИЦ ГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный педиатрический университет Минздрава России

И.В. Барсков¹, Е.В. Стельмашук², Г.А. Романова¹, Л.Г. Хаспеков²

Морфологическое исследование нейропротекторных свойств дипептидного миметика фактора роста нервов (ГК-2h) при фокальном ишемическом повреждении префронтальной коры головного мозга крыс

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

² Федеральное государственное бюджетное учреждение Научный центр неврологии Российской академии медицинских наук, 125367, Москва, Волоколамское ш., 80

Исследовано нейропротекторное действие дипептида ГК-2h, миметика фактора роста нервов, при двусторонней фокальной фотоиндуцированной ишемии префронтальной коры головного мозга крыс. Установлено, что внутрибрюшинное введение ГК-2h в дозе 0,1 мг/кг через 1 или 4 ч, а затем на 2-е, 4-е и 8-е сут. после индукции фототромбоза достоверно препятствует увеличению объема ишемического очага.

Ключевые слова: миметик фактора роста нервов, префронтальная кора головного мозга крысы, фотоиндуцированный тромбоз, нейропротекция

I.V. Barskov¹, E.V. Stelmashuk², G.A. Romanova¹, L.G. Khaspekov²

Morphological study of neuroprotective properties of dipeptide mimetic of nerve growth factor (GK-2h) in focal ischemic damage of rat brain prefrontal cortex

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

² Research Center of Neurology RAMS, 80, Volokolamskoye hwy., Moscow, 125367, Russia

The neuroprotective effects of dipeptide GK-2h, a mimetic of nerve growth factor, in bifocal photoinduced ischemia in rat brain prefrontal cortex was studied. It was shown that GK-2h, injected intraperitoneally in dose 0,1 mg/kg in 1 h or 4 h after operation and then on 2-nd, 4-th and 8-th days, prevented significantly on 9-th day from increasing volume of cortical infarction.

Key words: nervous growth factor mimetic, bifocal photoinduced ischemia, rat brain prefrontal cortex, neuroprotection

Эпидемиологические данные свидетельствуют о том, что инсульт является одной из ведущих причин смертности в развитых странах [1]. В фармакотерапии инсульта нейропротекция рассматривается как важнейший этап лечебных мероприятий [2, 3]. Поиск лекарственных средств, снижающих степень нейродегенерации и улучшающих мнестические функции при ишемии мозга, является актуальной фармакологической проблемой. Нейропротекторным эффектом обладают многие соединения, имеющие различный механизм действия. Исходя из патогенетических механизмов инсульта и известных данных о процессах сохранения и восстановления жизнеспособности нервной ткани, особое внимание уделяется нейротрофинам [5, 11, 13].

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

В результате многолетних фундаментальных исследований в Институте фармакологии им. В.В. Закусова РАМН создан оригинальный дипептидный миметик нейротрофического фактора роста нервов (ФРН) человека (ГК-2h), изучение которого в опытах *in vitro* дало основание предположить, что это соединение обладает нейропротекторными свойствами [8].

Цель исследования — изучение нейропротекторных свойств ГК-2h при фотоиндуцированном тромбозе кровеносных сосудов коры головного мозга крысы — экспериментальной модели, воспроизводящей клиническую картину фокального ишемического инсульта [6, 12, 14]. Данная модель ранее валидизирована с использованием препаратов, обладающих нейропротекторным и антимнестическим действием и применяемых для фармакологической коррекции ишемической церебральной патологии [6, 9, 12, 16].

Методика

Опыты выполнены на самцах беспородных белых крыс массой 180—200 г, содержащихся в виварии при свободном доступе к пище и воде и естественной смене светового режима. При работе соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований.

Все экспериментальные животные были разделены на 4 группы:

- группа 1 — ложнооперированные;
- группа 2 — фототромбоз с введением 0,9%-ного раствора NaCl (физраствор);
- группа 3 — фототромбоз с введением ГК-2h через 1 ч, 2, 4 и 8 сут. после операции;
- группа 4 — фототромбоз с введением ГК-2h через 4 ч, 2, 4 и 8 сут. после операции.

ГК-2h вводили внутрибрюшинно в дозе 0,1 мг/кг.

Двусторонний фокальный ишемический инфаркт префронтальной коры головного мозга крыс (поля Fr1 и Fr2, согласно атласу [15]), создавали методом фотоиндуцированного тромбоза [19]. Животных наркотизировали хлоралгидратом (300 мг/кг, в/б). Фотосенсибилизирующий краситель бенгальский розовый (Sigma Chem. Co.) вводили в яремную вену (3%-ный раствор в воде, 40 мг/кг). Голову животных фиксировали в стереотаксисе и после продольного разреза кожи удаляли надкостницу.

Световод (диаметр светового пучка на выходе 3 мм) устанавливали на расстоянии 1 мм от поверхности черепа по координатам: 2,0 мм ростральнее брегмы и 2,0 мм латеральнее саггитального шва. Облучение холодным светом (источник — ксеноновая лампа 25 В, 250 Вт) проводили в течение 15 мин с каждой стороны. Животные 1-й группы подвергались тем же процедурам, за исключением введения бенгальского розового.

Головной мозг у всех животных извлекали на 9-е сут. после индукции фототромбоза. Под глубоким наркозом (3% хлоралгидрат) производили суправитальную транскардиальную перфузию, сначала физиологическим раствором, затем фиксирующей смесью спирта, формалина и ледяной уксусной кислоты (ФУС) в отношении 7:2:1 соответственно [4]. Срезы мозга толщиной 100 мкм окрашивали крезильовым фиолетовым по методу Ниссля. Далее препараты обрабатывали по стандартной гистологической методике: обезвоживали в спиртах восходящих концентраций, просветляли в ксилоле и заключали в балъзам.

Для морфометрического измерения площади очага серийного среза и объема ишемического повреждения мозг фиксировали методом погружения в ФУС. После фиксации материал переносили на сутки в 70%-ный спирт и резали в дистиллированной воде на

вибротоме 1000 (Tecnical Product international inc., USA) с шагом 100 мкм. Каждый второй срез последовательно монтировали на предметных стеклах, покрытых желатиной, и окрашивали 0,2% метиленовым синим. Гистологические препараты сканировали на слайдовой приставке сканера V100 PHOTO (Epson, USA). Этот метод позволяет получить файл с изображением среза мозга нежно-голубого цвета, на котором четко виден очаг ишемического повреждения — темноокрашенный по краю в зоне некротической гибели клеток, и светлый в середине — зоне глио-мезодермального рубца (рис. 2). Иногда некротическая ткань распадается, в таком случае очагом поражения считали недостающий участок ткани. Для определения площади ишемического повреждения использовали специализированную компьютерную программу ImageJ («Bethesda», США).

Объем очага повреждения определяли по формуле:

$$V = \sum S_n \times d,$$

где:

d — толщина пары срезов (200 мкм);

S_n — измеренная площадь ишемического очага серийного среза в мм²;

\sum — сумма объемов ишемического повреждения на срезах.

Коэффициент эффективности защиты (КЭЗ) рассчитывали по формуле:

$$КЭЗ = (V_0 - V_B) / V_{0X} \times 100\%,$$

где:

V_0 — средний объем очага поражения с введением физраствора;

V_B — средний объем очага поражения с введением препарата.

Этот параметр позволяет сравнивать эффективность действия различных веществ на разных моделях ишемии.

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы «Statistica 6.0». Нормальность распределения признака в выборке оценивали по W -критерию Шапиро—Уилка. Для статистического анализа объемов инфаркта использовали тест ANOVA с посттестом Dunnett's Multiple Comparison. Отличия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Результаты выражали как среднее \pm SEM.

Результаты и обсуждение

На гистологических срезах префронтальной коры головного мозга, взятых у животных 2-й группы (без введения ГК-2h) и окрашенных по методу Ниссля, в ишемическом очаге выявлялась зона тотального некроза, содержащая необратимо поврежденные нейроны, и зона так называемой «пенумбры» (от лат. ре-

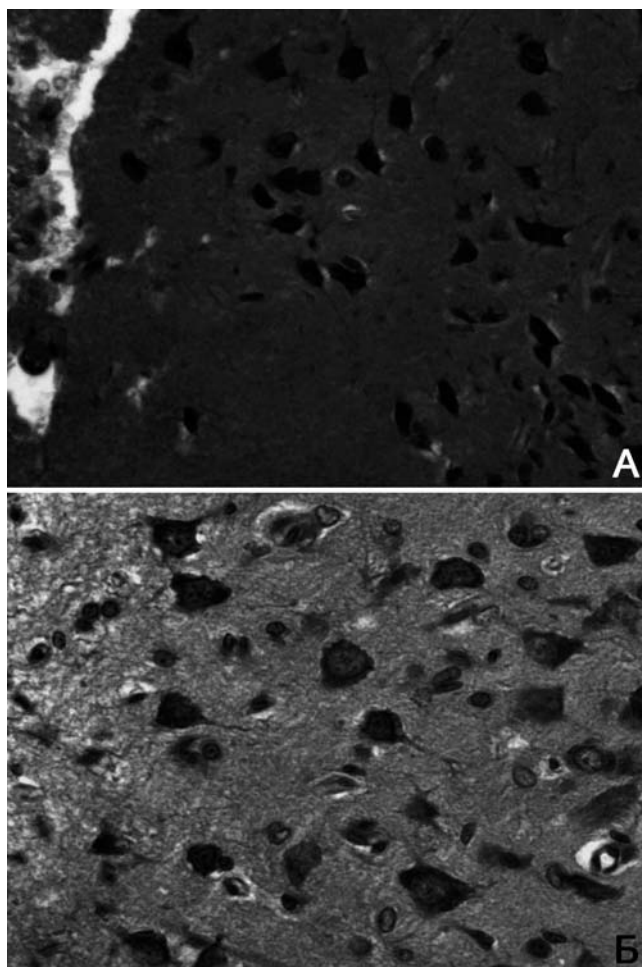


Рис. 1. Гистологические срезы префронтальной коры головного мозга крысы через 9 сут. после фотоиндуцированного тромбоза. А — в отсутствие ГК-2h; Б — в присутствии ГК-2h, введенного через 4 ч и на 2-е, 4-е и 8-е сут. после фототромбоза. Окраска по методу Ниссля. Масштаб 30 мкм.



Рис. 2. Одноуровневые фронтальные срезы мозга крыс через 9 сут. после двустороннего фототромбоза. 1 — в отсутствие ГК-2h; 2 — в присутствии ГК-2h, введенного через 1 ч и на 2-е, 4-е и 8-е сут. после фототромбоза; 3 — в присутствии ГК-2h, введенного через 4 ч и на 2-е, 4-е и 8-е сут. после фототромбоза. Окраска метиленовым синим. Темноокрашенная область очага — зона некроза, центральная область — глиомезодермальный рубец. Масштаб 3 мм.

pumbra — полутень), в которой обнаруживались нейроны с признаками повреждения (перичеллюлярный отек, гиперхромность, сморщивание тел нейронов, гомогенизация цитоплазмы, исчезновение глубоких хроматина, изменение конфигурации ядра), характерными для данной стадии постишемического периода (рис. 1 А). Наблюдались также выраженный периваскулярный отек с диффузным смещением клеточных структур.

В гистологических препаратах головного мозга животных 3-й и 4-й групп некротические изменения в префронтальной коре были менее значительны. В пenumбре преобладали нейроны с минимально измененной структурой (рис. 1 Б), а периваскулярный отек был выражен слабее.

При сопоставлении отдельных срезов и при пространственной реконструкции очагов ишемического повреждения мозга животных 2-й, 3-й и 4-й групп защитный эффект ГК-2h отчетливо выражен (рис. 2 и 3). Морфометрическое исследование показало, что общий объем повреждения коры головного мозга крысы при двустороннем фототромбозе в отсутствие ГК-2h составил в среднем 29 мм^3 (примерно 2% объема всего мозга), при этом мозг ложнопериорированных крыс оставался интактным. Средний объем ишемического очага во 2-й группе животных составил $14,0 \pm 3,1 \text{ мм}^3$ ($n = 5$), тогда как в 3-й группе — $7,4 \pm 1,1 \text{ мм}^3$ ($n = 6$, $p < 0,05$, отличие от животных 2-й группы), а в 4-й — $4,9 \pm 1,3 \text{ мм}^3$ ($n = 5$, $p < 0,01$, отличие от животных 2-й группы). Рассчитанные коэффициенты эффективности защиты в 3-й и 4-й группах составили соответственно 47 и 65%.



Рис. 3. Объемная реконструкция очагов ишемического повреждения при двустороннем фототромбозе. 1 — в отсутствие ГК-2h; 2 — в присутствии ГК-2h, введенного через 1 ч и на 2-е, 4-е и 8-е сут. после фототромбоза; 3 — в присутствии ГК-2h, введенного через 4 ч и на 2-е, 4-е и 8-е сут. после фототромбоза. Окраска метиленовым синим. Масштаб 3 мм.

На сегодняшний день все имеющиеся нейропротекторы, испытанные в мультифокальных клинических исследованиях, недостаточно эффективны [17], поэтому разработка новых подходов к терапии и профилактике инсульта является важнейшей задачей фундаментальной медицины [3]. В настоящее время большое внимание уделяется созданию нейропротекторных средств, значительное место в которых занимают полипептиды и ростовые факторы [7, 9, 12, 16, 18].

В наших экспериментах показана более высокая эффективность соединения ГК-2h при введении через 4 ч, чем через 1 ч, после ишемического повреждения коры, что свидетельствует о повышении терапевтической активности препарата в ходе развития ишемии. Таким образом, увеличивается длительность терапевтического окна и расширяется период эффективности лечебного применения ГК-2h.

Исследование действия ГК-2h на моделях окислительного стресса, глутаматной токсичности и 6-оксидоаминового повреждения клеток *in vitro* показало наличие у данного низкомолекулярного пептидного аналога ФРН нейропротекторной активности, проявляемой в малых концентрациях и сходной с активностью самого ФРН [8]. Полученные результаты подтверждают обнаруженные в опытах *in vitro* нейропротекторные свойства ГК-2h и свидетельствуют о перспективности дальнейшей разработки препарата в качестве потенциального противоишемического средства.

Список литературы

1. Болезни нервной системы. Руководство для врачей в 2-х т. / Под ред. Яхно Н.Н., Штульмана Д.Р. 3-е изд-е, перераб. и доп. — М.: Медицина, 2003. — Т. 1.
2. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Мясоедов Н.Ф. и др. // Журнал неврологии и психиатрии. — 1997. — №6. — С. 26—34.
3. Инсульт: диагностика, лечение, профилактика / Под ред. З.А. Суслиной, М.А. Пирадова. — М.: Медпресс-Информ, 2008. — 288 с.
4. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. — М.: Мир, 1969. — С. 40.
5. Пальцын А.А., Константинова Н.Б., Шакова Ф.М., Кубатиев А.А. Роль слияния клеток в физиологической и репаративной регенерации коры головного мозга // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 2009. — Т. 148, №5. — С. 580—583.

6. Романова Г.А. Дизрегуляционное нарушение интегративной деятельности мозга при фокальной ишемии коры // Дизрегуляционная патология: Руководство для врачей и биологов / Под ред. Г.Н. Крыжановского. — М.: Медицина, 2002. — С. 605—615.

7. Романова Г.А., Силачев Д.Н., Шакова Ф.М. и др. Нейропротективное и антиамнестическое действие пептида семакса при экспериментальном ишемическом инфаркте коры головного мозга // Бюлл. Экспер. биол. — 2006. — Т. 142, №12. — С. 618—621.

8. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. Заявка на изобретение рег. №2009105176, приоритет от 16.02.2009.

9. Шакова Ф.М., Давыдова Т.В., Романова Г.А. Влияние антител к глутамату на сохранение памяти и уровень нейромедиаторных аминокислот в структурах мозга крыс при ишемическом повреждении префронтальной коры // Патогенез. — 2013. — Т. 11, №2. — С. 49—63.

10. Connor B., Dragunow M. // Brain Res. Rev. — 1998. — Vol. 27. — P. 1—39.

11. Ford G.A. Clinical pharmacological issues in the development of acute stroke therapies // Brit. J. Pharm. — 2008. — Vol. 153. — P. 112—119.

12. Ostrovskaya R.U., Romanova G.A., Barskov L.V. et al. // Behav. Pharmacol. — Memory restoring and neuroprotective effects of the proline-containing dipeptide, GVS-111, in a photochemical stroke model. — 1999. — Vol. 10(5). — P. 549—553.

13. Pollack S.J., Harper S.J. // Drug News and Perspectives. — 2002. — Vol. 15 (5). — P. 268—277.

14. Padosh S.A., Vogel P., Bottiger B.W. Neuronal apoptosis following cerebral ischemia. Basis, physiopathology and treatment strategies // Anaesthesist. — 2001. — Vol. 50 (12). — P. 905—920.

15. Paxinos G., Watson S. Atlas of anatomy of rat brain. The rat brain in stereotaxic coordinates. — San Diego: Academic Press, 1986.

16. Romanova G.A., Silachev D.N., Shakova F.M. Neuroprotective and anti-amnestic actions of Semax in experimental ischemic cerebral cortical infarct // Bull. Exp. Biol. Med. — 2006. — Vol. 142 (12). — P. 612—628.

17. Rother J. Neuroprotection does not work // Stroke. — 2008. — Vol. 39. — P. 523—524.

18. Sutherland B.A., Minnerup J., Balami J.S. Neuroprotection for ischaemic stroke: Translation from the bench to the bedside // Int. J. Stroke. — 2012. — Vol. 7. — P. 407—418.

19. 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 02.10.13

Сведения об авторах:

Барсков Игорь Валентинович, канд. мед. наук, лаб. гипоксических повреждений мозга ФГБУ «НИИОПП» РАМН
 Стельмашук Елена Викторовна, д-р биол. наук, лаб. экспериментальной нейробиологии, отд. исследований мозга ФГБУ «НЦН» РАМН
 Хаспеков Леонид Георгиевич, д-р биол. наук, рук. лаб. экспериментальной нейробиологии, отд. исследований мозга ФГБУ «НЦН» РАМН

И.А. Тараканов¹, Л.Н. Тихомирова¹, А.Г. Жукова², В.А. Сафонов¹

Устойчивость нервной ткани ствола мозга к свободнорадикальному окислению у крыс при периодическом дыхании после введения оксибутирата

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

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Новокузнецк, 654041, ул. Кутузова, 23

У беспородных белых крыс-самцов под пентобарбиталовым наркозом оценивали резистентность ткани к свободнорадикальному окислению при возникновении у них патологического периодического дыхания после введения оксибутирата. Показали, что оксибутират модулирует про- и антиоксидантный статус в ткани мозга. У крыс без периодического дыхания оксибутират вызывал меньшее снижение резистентности мембранных структур ткани продолговатого мозга к индукции свободнорадикального окисления. У крыс с периодическим дыханием при действии оксибутирата повышалась чувствительность мембранных структур ткани продолговатого мозга к индукции свободнорадикального окисления. Полагают, что в патогенезе формирования патологических типов дыхания принимают участие клеточные метаболические и/или мембранные механизмы, активация которых в сетях генерации дыхательного ритма приводит к формированию патологического типа дыхания.

Ключевые слова: дыхательный центр, резистентность к свободнорадикальному окислению, периодическое дыхание, оксибутират, крыса

I.A. Tarakanov¹, L.N. Tikhomirova¹, A.G. Zhukova², V.A. Safonov¹

The resistance of low brainstem tissue to free radical oxidation in rats during periodic breathing following hydroxybutyrate treatment

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

² Institute for Complex Problems of Hygiene and Occupational Diseases SB RAMS, 23, Kutuzov street, Novokuznetsk, 654041

We evaluated tissue resistance to free radical oxidation, in pentobarbital-anesthetized mongrel albino male rats during pathologic periodic breathing following hydroxybutyrate (GHBA) administration. It was shown that GHBA modulated pro- and antioxidant status of brain tissue. In the absence of periodic breathing after GHBA, decreases in resistance of brainstem tissue membranes to induction of free radical oxidation were slightly pronounced. Rats with GHBA-induced periodic breathing exhibited increased membrane sensitivity of medullar neurons to induction of free radical oxidation. We suggest that cellular metabolism and/or membrane mechanisms of respiratory rhythm-generating neurons play a role in the pathogenesis of periodic breathing.

Key words: respiratory center, resistance to free radical oxidation, periodic breathing, hydroxybutyrate, rat

Ранее нами было показано, что системное введение крысам оксибутирата вызывает резкое замедление частоты дыхательных движений, которое впоследствии у большинства животных сменяется специфическим типом дыхания, характеризующимся периодическими задержками дыхания в фазе спокойного выдоха [3]. Эти наблюдения согласуются с разработанной нами концепцией [6] о нейрогуморальных механизмах нарушений регуляции дыхания центрально-

го генеза, в соответствии с которой в формировании патологических типов дыхания важнейшую роль играют изменения состава внеклеточной жидкости и ликвора в области дыхательного центра и, прежде всего, увеличение содержания тормозных медиаторов, таких, как ГАМК [4, 5]. Можно полагать, что в механизме формирования патологического периодического дыхания при гипоксии мозга важное значение имеют энергетическое состояние и баланс про- и антиоксидантных систем центрального регулятора дыхания. Выяснение возможного участия ГАМК-позитивных препаратов в этих процессах важно еще и по-

Для корреспонденции: Тараканов Игорь Анатольевич, д-р биол. наук, главн. науч. сотр. лаб. патофизиологии дыхания ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: inspiration@mtu-net.ru

тому, что участие ГАМК является дополнительным подтверждением адекватности этого способа моделирования терминальных типов дыхания, наблюдаемых у больных в коматозном состоянии, характеризующемся дефицитом энергии и повышением уровня окислительных процессов, в том числе перекисным окислением липидов.

Цель исследования — оценка резистентности структур продолговатого мозга к свободнорадикальному окислению при возникновении у них патологического периодического дыхания с задержками в фазу спокойного выдоха после введения оксибутирата.

Методика

Опыты выполнены на 19 беспородных белых крысах-самцах массой от 400 до 600 г под пентобарбиталовым наркозом (этамилал натрия, 45-50 мг/кг внутривенно). При появлении реакции на сжатие конечности внутривенно дополнительно вводили пентобарбитал из расчета 5-10% от исходной дозы. Температуру тела поддерживали на уровне $38,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ с помощью инфракрасной лампы. Хирургическая подготовка животных к эксперименту

аналогична описанной ранее [7]. Для получения доступа к заднему мозгу удаляли затылочную и части теменных костей черепа. Крысы были разбиты на 3 группы:

- А — без введения оксибутирата (контроль);
- Б — без развития периодического дыхания (только с замедлением дыхательного ритма) после введения оксибутирата;
- В — с устойчивым развитием периодического дыхания после введения оксибутирата.

Оксибутират лития вводили внутривенно медленно в дозе 750 мг/кг [8]. Забор ткани мозга осуществляли пересечением ствола мозга на уровне от 5 мм выше задвижки до уровня затылочного отверстия. Таким образом, для последующего биохимического анализа использовали участок ствола мозга, включающий нижнюю часть варолиева моста и продолговатый мозг, в котором расположены основные структуры автоматического центрального регулятора дыхания. Указанный участок мозга извлекали у крыс контрольной группы — без введения оксибутирата, у остальных крыс — через 30—45 мин после введения препарата.

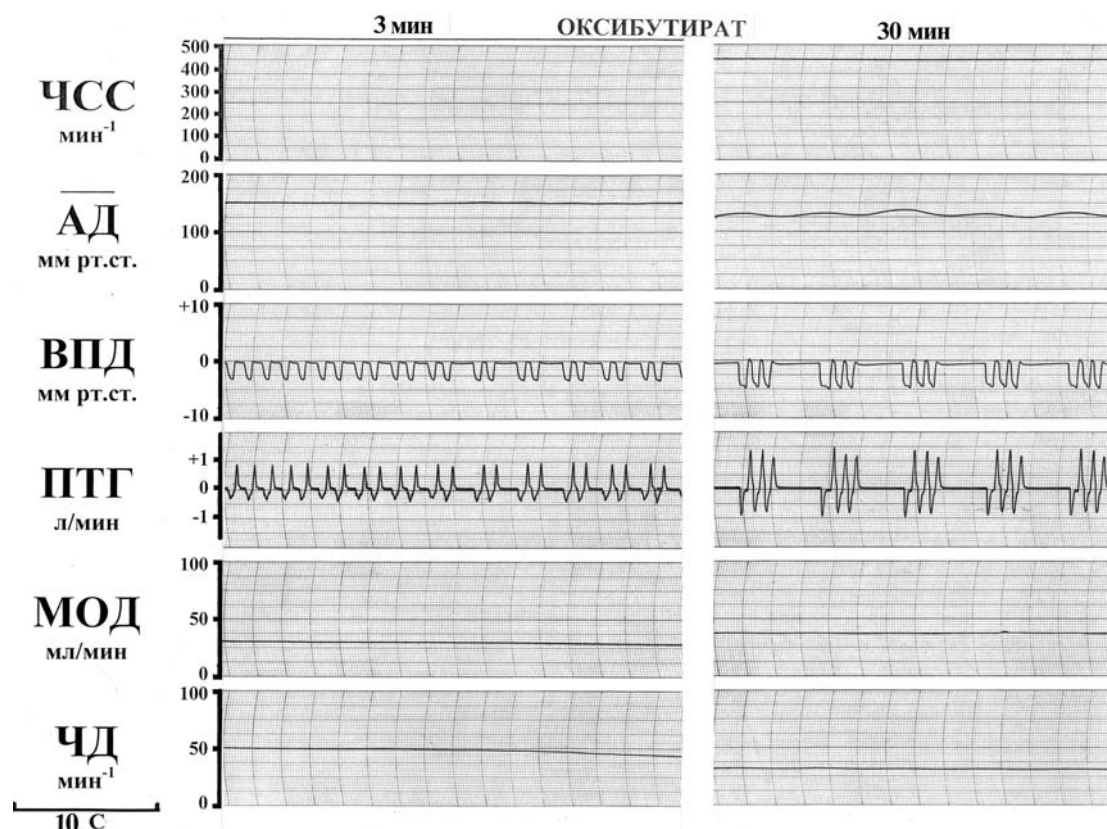


Рис. 1. Изменения внешнего дыхания и гемодинамики у крысы группы (в) после введения оксибутирата: ЧСС — частота сердечных сокращений (мин^{-1}); АД — среднее системное артериальное давление (мм рт.ст.); ВПД — внутрипищеводное давление (мм рт.ст.); ПТГ — пневмотахограмма (л/мин); МОД — минутный объем дыхания (мл/мин); ЧД — частота дыхания (мин^{-1}). Внизу — отметка времени. Сверху указано время после введения оксибутирата.

Выделенный участок продолговатого мозга замораживали в жидком азоте до исследования. Измельчение ткани продолговатого мозга проводили в гомогенизаторе тефлон—стекло в 3 приема в течение 30 с при соотношении ткань—среда, равном 1:10. Среда гомогенизирования содержала 30 мМ Tris, 100 мМ NaCl (рН 7,4 при 4°C).

Резистентность ткани продолговатого мозга к свободнорадикальному окислению определяли *in vitro*, индуцируя окисление в системе, содержащей аскорбат (0,2 мМ) при концентрации белка не выше 3 мг/мл.

Концентрацию продуктов свободнорадикального окисления оценивали по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) по классическому методу [10] в модификации [9] на спектрофотометре Hitachi-557.

Концентрацию белка измеряли, используя подход [11], по амплитуде 4-й производной спектра поглощения в области 240—320 нм.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия Манна—Уитни U-test согласно рекомендациям по проведению биомедицинской статистики [2].

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлен пример патологического дыхания, развивающегося у большинства крыс в возрасте старше 3 мес. после введения оксибутирата и характеризующегося группировкой дыхательных движений, разделенных периодами удлиненного спокойного выдоха. Обычно число дыхательных движений в группе колебалось от 2 до 4 (чаще всего по 2) и в некоторых опытах могло изменяться. Животных с таким типом дыхания относили к группе В. Если после введения препарата изменения ограничивались только замедлением частоты дыхательных движений, что наблюдали у меньшего количества животных, то их относили к группе Б (рис. 2).

Чрезмерная активация свободнорадикального окисления является ранним универсальным, неспецифическим показателем наличия повреждения и характерна для самых различных заболеваний. О состоянии свободнорадикальных процессов в ткани продолговатого мозга при введении оксибутирата судили на основании показателя состояния антиоксидантной защиты — скорости индуцибельного накопления продуктов свободнорадикального окисления.

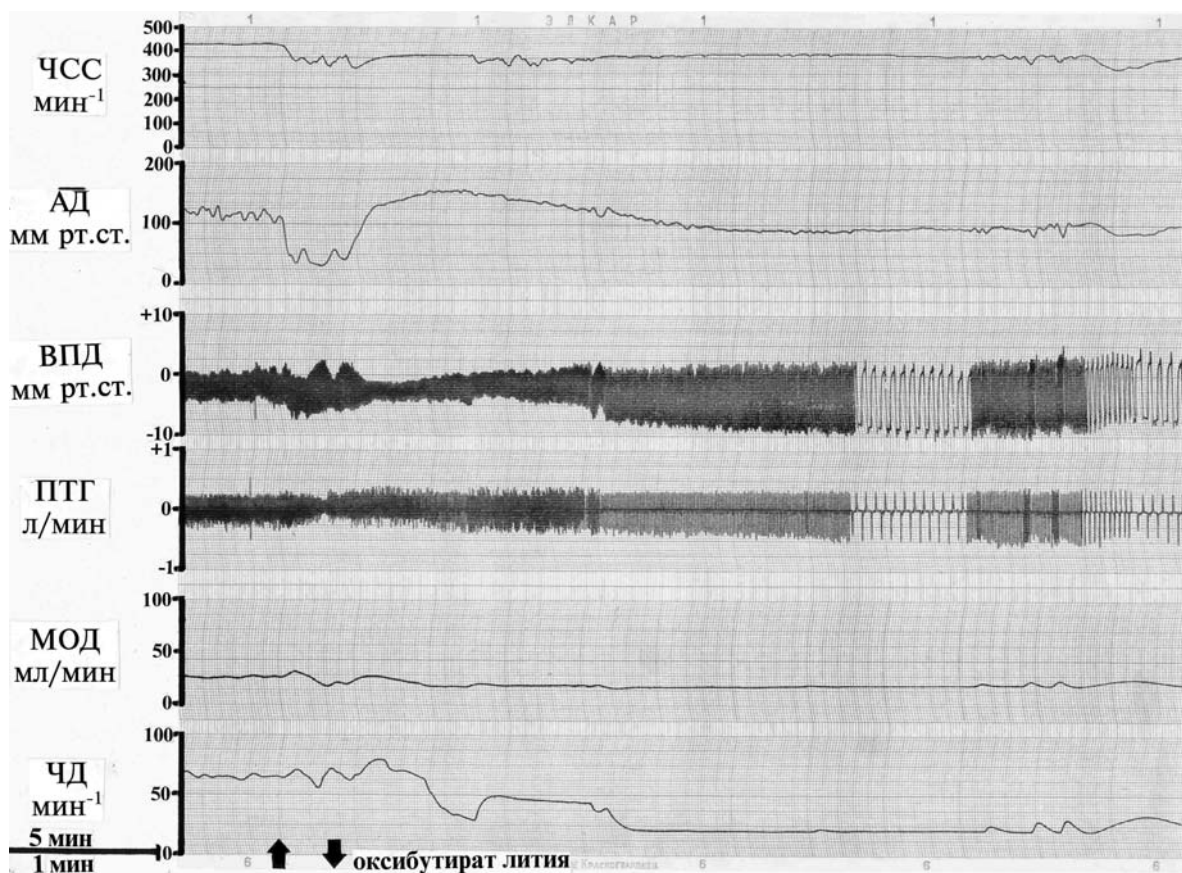


Рис. 2. Изменения внешнего дыхания и гемодинамики у крысы группы (б) после введения оксибутирата. Обозначения см. на рис. 1. Стрелками снизу показан период введения оксибутирата.

Уровень ТБК-активных продуктов окисления в продолговатом мозге крыс

Группа животных	0 мин	30 мин	60 мин	90 мин
Группа А. Контроль (n=8)	0,015±0,005	0,073±0,004	0,155±0,005	0,238±0,010
Группа Б. Без периодического дыхания (n=5)	0,012±0,002	0,082±0,004* p≤0,05	0,174±0,005* p≤0,01	0,252±0,020
Группа В. С периодическим дыханием (n=6)	0,017±0,005	0,087±0,020	0,197±0,050* p≤0,05	0,273±0,030 p≤0,05

Примечание. Достоверность отличий: * — по сравнению с контролем

Данные по скорости индуцибельного накопления продуктов окисления и по изменению уровня ТБК-активных продуктов в ткани продолговатого мозга представлены в таблице. Видно, что введение оксибутирата крысам не приводило к изменению начального уровня продуктов индуцированного окисления активными формами кислорода (АФК). Однако введение оксибутирата крысам повышало чувствительность ткани продолговатого мозга к свободнорадикальному окислению: через 60 мин и 90 мин после индукции окисления *in vitro* скорость накопления АФК-продуктов была на 15—29% выше по сравнению с контролем в обеих группах. Важно отметить, что наибольшая активация свободнорадикальных процессов *in vitro* зарегистрирована у крыс с развитием периодического дыхания.

Таким образом, нами показано, что оксибутират модулирует про- и антиоксидантный статус в ткани мозга. При этом клеточный ответ на введение оксибутирата зависит от индивидуальной устойчивости крыс. Так, у крыс без периодического дыхания оксибутират приводил к меньшему снижению резистентности (т.е. к меньшему повреждению) мембранных структур продолговатого мозга к индукции свободнорадикального окисления. У крыс с периодическим дыханием при действии оксибутирата повышалась чувствительность мембранных структур ткани продолговатого мозга к индукции свободнорадикального окисления (и, вероятно, к повреждению) по сравнению с крысами без периодического дыхания. Следовательно, после введения оксибутирата в нервной ткани нижней части ствола головного мозга крыс, судя по уровню ТБК-активных продуктов окисления, происходят выраженные изменения баланса про- и антиоксидантных систем. Эти изменения могут отражаться как на энергетическом состоянии нервных клеток, так и на свойствах их мембран. Характерно, что выявленные изменения были более значительными у крыс группы В, демонстрировавших отчетливое периодическое дыхание с задержками в фазе спокойного выдоха. Можно полагать, что имеется некоторый критический уровень сдвига резистентности тка-

ни продолговатого мозга к свободнорадикальному окислению, при котором формируется указанный тип патологического периодического дыхания.

Предотвращение и устранение активации свободнорадикального окисления помогает во многих случаях предотвратить прогрессирование патологического процесса или облегчает его течение. В связи с этим важно установить, как влияют препараты, применяемые для лечения тех или иных заболеваний, на уровень про- и антиоксидантов в тканях, так как характер изменений свободнорадикальных процессов под влиянием лекарственных средства может являться одним из показателей, определяющих выбор препарата при той или иной патологии [1].

Проведенное исследование свидетельствует о том, что в патогенезе формирования патологических типов дыхания, характеризующихся нарушениями дыхательного ритма, кроме накопления нейромедиаторов в спинно-мозговой жидкости в зоне дыхательного центра, дополнительное участие принимают и клеточные метаболические и/или мембранные механизмы, активация которых в сетях генерации дыхательного ритма приводит к переходу от одного типа патологического дыхания к другому, что нередко наблюдается в клинике. Дальнейшее изучение состояния метаболизма и мембранных структур мозга будет способствовать разработке патогенетических методов коррекции дыхания у тяжело больных с центральными нарушениями дыхания и, тем самым, к повышению эффективности их лечения.

Список литературы

1. **Моругова Т.В., Лазарева Д.Н.** Влияние лекарственных средств на свободнорадикальное окисление // Эксперим. и клин. фармакология. — 2000. — Т. 63, №1. — С. 71—75.
2. **Платонов А.Е.** Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. — М.: Изд-во РАМН, 2000. — 51 с.
3. **Тараканов И.А., Сафонов В.А.** Сравнительный анализ изменений дыхания и системного кровообращения у кошек и крыс при активировании ГАМК-рецепторов // Физиол. журн. — 1998. — Т. 84, №4. — С. 300—308.

4. **Тараканов И.А., Сафонов В.А.** ГАМКергическая система и ее значение для регуляции дыхания // Физиология человека. — 1998. — Т. 24, №5. — С. 116—128.

5. **Тараканов И.А., Сафонов В.А.** ГАМКергические механизмы нарушений дыхательного ритма // Патол. физиол. Экспер. тер. — 1998. — №2. — С. 48—54.

6. **Тараканов И.А., Сафонов В.А.** Нейрогуморальная концепция нарушений центральной регуляции дыхания // Патогенез. — 2003. — №2. — С. 11—24.

7. **Тараканов И.А., Тихомирова Л.Н., Лебедева М.А., Тарасова Н.Н., Сафонов В.А.** Нарушения характера дыхания, возникающие под действием ГАМК-ергических веществ // Патогенез. — 2005. — №3. — С. 52—58.

8. **Hedner J.A., Jonason J., Lundberg D.** Respiratory effects of gamma-hydroxybutyric acid in anesthetized rats // Neural. Transm. — 1980. — Vol. 49. — P. 179—186.

9. **Kikugawa K., Kojima T., Yamaki S., Kosugi H.** Interpretation of the thiobarbituric acid reactivity of rat liver and brain homogenates in the presence of ferric ion and ethylenediaminetetraacetic acid // Analyt. Biochem. — 1992. — Vol. 202. — P. 249—255.

10. **Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // Analyt. Biochem. — 1979. — Vol. 95. — P. 351—358.

11. **Padros E., Dunach M., Morros A., Sabes M., Manosa J.** 4-th-derivative spectrophotometry of proteins // Trends in Biochem. Sci. — 1984. — Vol. 9, №12. — P. 508—510.

Поступила 03.07.13

Сведения об авторах:

Сафонов Виктор Авраамович, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. патофизиологии дыхания ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Людмила Николаевна Тихомирова, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. патофизиологии дыхания ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Жукова Анна Геннадьевна, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. экспериментальных гигиенических исследований ФГБУ «НИИКППИЗ» РАМН

Е.Б. Манухина^{1,2}, О.Л. Терехина¹, Л.М. Белкина¹, Д.В. Абрамочкин³,
О.П. Буданова¹, С.Ю. Машина¹, Б.В. Смирин¹, Е.Б. Якунина¹, Г.Ф. Дауни²

Вазопротекторный эффект адаптации к гипоксии при ишемическом и реперфузионном повреждении сердца

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

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

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские Горы, 1

Известно, что адаптация к гипоксии обладает выраженным кардиопротекторным эффектом при ишемическом и реперфузионном (ИР) повреждении сердца. Цель данной работы состояла в изучении возможности предупреждения дисфункции эндотелия сосудов с помощью адаптации к периодической нормобарической гипоксии при ИР повреждении миокарда крысы. Адаптацию к нормобарической гипоксии проводили в гипоксической камере циклами (5–10 мин гипоксии и 4 мин нормоксии, 5–8 циклов в день) в течение 21 дня. Оценка эндотелиальной функции коронарных сосудов проводилась после ИР повреждения изолированного сердца *in vitro* (15 мин ишемии, 10 мин реперфузии) по увеличению скорости потока в ответ на введение ацетилхолина. Оценку эндотелийзависимого расслабления изолированной аорты крысы проводили после создания ИР повреждения миокарда *in situ* (30 мин ишемии и 60 мин реперфузии) по реакции на ацетилхолин на фоне сокращения, вызванного норадреналином. Главные результаты, полученные в настоящем исследовании, состояли в том, что 1) ИР повреждение миокарда вызывало дисфункцию эндотелия не только коронарных сосудов, но и аорты, т.е. некоронарного сосуда, удаленного от зоны ИР повреждения; 2) адаптация к гипоксии предупреждала дисфункцию эндотелия как коронарных, так и некоронарных сосудов, вызванную ИР повреждением. Таким образом, адаптация к гипоксии обладает не только кардиопротекторным, но и вазопротекторным эффектом при ИР повреждении миокарда.

Ключевые слова: адаптация к гипоксии, ишемическое и реперфузионное повреждение миокарда, дисфункция эндотелия, коронарные сосуды, аорта

E.B. Manukhina^{1,2}, O.L. Terekhina¹, L.M. Belkina¹, D.V. Abramochkin³,
O.P. Budanova¹, S.Yu. Mashina¹, B.V. Smirin¹, E.B. Yakunina¹, H.F. Downey²

Vasoprotective effect of adaptation to hypoxia in myocardial ischemia and reperfusion injury

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

² University of North Texas Health Science Center, Fort Worth, USA

³ Lomonosov Moscow State University, 1, Leninskie Gory, 119991, Moscow, Russia

Adaptation to hypoxia is known to be cardioprotective in ischemic and reperfusion (IR) injury of the myocardium. This study was focused on investigating a possibility for prevention of endothelial dysfunction in IR injury of the rat heart using adaptation to intermittent hypoxia, which was performed in a cyclic mode (5–10 min of hypoxia interspersed with 4 min of normoxia, 5–8 cycles daily) for 21 days. Endothelial function of coronary blood vessels was evaluated after the *in vitro* IR of isolated heart (15 min of ischemia and 10 min of reperfusion) by the increment of coronary flow rate in response to acetylcholine. Endothelium-dependent relaxation of isolated rat aorta was evaluated after the IR myocardial injury *in situ* (30 min of ischemia and 60 min of reperfusion) by a relaxation response of noradrenaline-precontracted vessel rings to acetylcholine. The following major results were obtained in this study: 1) IR myocardial injury induced endothelial dysfunction of coronary blood vessels and the aorta, a non-coronary blood vessel, remote from the IR injury area; and 2) adaptation to hypoxia prevented the endothelial dysfunction of both coronary and non-coronary blood vessels associated with the IR injury. Therefore, adaptation to hypoxia is not only cardioprotective but also vasoprotective in myocardial IR injury.

Key words: adaptation to hypoxia, myocardial ischemia and reperfusion injury, endothelial dysfunction, coronary blood vessels, aorta

Для корреспонденции: Манухина Евгения Борисовна, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. регуляторных механизмов адаптации ФГБУ «НИИОПП» РАМН, адъюнкт-профессор отд. интегративной физиологии Центра медицинских наук Университета Северного Техаса. E-mail: manukh@mail.ru.

Ранее нами показано, что адаптация к периодической нормобарической гипоксии обладает выраженным кардиопротекторным эффектом при ишемическом и реперфузионном (ИР) повреждении сердца [1]. В экспериментах на изолированном сердце крыс, перфузируемом по Лангендорфу, адаптация к гипоксии снижала частоту и длительность всех видов ишемических аритмий и ограничивала размер ишемического некроза миокарда. Кардиопротекторное действие адаптации к гипоксии при ИР подтверждается и другими исследователями [7, 13, 27, 31]. В клинике интервальная гипоксическая тренировка успешно применялась для лечения аритмий у пациентов с ишемической болезнью сердца [9, 15, 16].

Известно, что ИР сердца вызывает повреждение не только миокарда, но и эндотелия коронарных сосудов, которое проявляется длительной и выраженной дисфункцией, связанной со структурными и функциональными изменениями эндотелиоцитов [11], нарушением активности эндотелиальной NO-синтазы [23] и снижением биодоступности NO в результате усиленного разрушения активными формами кислорода [24]. Наши исследования и данные других авторов свидетельствуют о возможности предупреждения дисфункции эндотелия сосудов с помощью адаптации к гипоксии. Так, адаптация к нормобарической [18] и к гипобарической гипоксии [3] предупреждала угнетение эндотелийзависимого расслабления аорты спонтанно-гипертензивных крыс линии SHR, а также дисфункцию эндотелия мозговых сосудов у крыс при экспериментальной болезни Альцгеймера [4]. Показано также, что гипоксическое прекондиционирование, проведенное *in vitro*, предупреждает нарушения эндотелиальной функции изолированных сосудов [8]. Однако возможность предупреждения дисфункции эндотелия коронарных сосудов с помощью адаптации к гипоксии до настоящего времени не изучалась, и адаптация к нормобарической гипоксии для предупреждения эндотелиальной дисфункции ранее не использовалась.

В последнее время показано, что при ИР повреждении сердца могут страдать также и отдаленные, некоронарные сосуды, например, сосуды брыжеечного русла [29]. Поскольку подобные отдаленные повреждения сосудов могут играть важную роль в развитии многих осложнений ИР повреждения сердца, вопрос о вовлечении некоронарных сосудов в ИР повреждение миокарда и оценка возможности предупреждения дисфункции эндотелия некоронарных сосудов требует дальнейшего изучения.

Цель работы — в изучении вазопротекторных эффектов адаптации к периодической нормобарической гипоксии при ИР повреждении миокарда крыс *in vitro* и *in situ*.

Методика

Эксперименты выполнены на крысах-самцах Вистар массой 250—300 г. Использованы следующие группы животных:

- 1) контроль;
- 2) адаптация к гипоксии;
- 3) ИР;
- 4) адаптация к гипоксии + ИР.

Адаптацию к нормобарической гипоксии проводили в гипоксической камере циклами. Каждый цикл состоял во вдыхании гипоксической газовой смеси (9,5—10% O₂) в течение 5—10 мин, чередующимся с дыханием атмосферным воздухом в течение 4 мин. Каждый сеанс адаптации состоял из 5—8 циклов ежедневно. Полный курс адаптации длился 21 сут. Контрольные животные находились в тех же условиях, при которых проводилась адаптация к гипоксии, в течение 21 сут., но вместо гипоксической газовой смеси дышали атмосферным воздухом.

Оценку эндотелийзависимой функции коронарных сосудов проводили после ИР повреждения изолированного сердца *in vitro*. После декапитации животных сердце выделяли и перфузировали по Лангендорфу раствором Кребса—Хензелейта (NaCl 118,0 мМ, KCl 4,7 мМ, NaHCO₃ 25,0 мМ, MgSO₄ 1,2 мМ, CaCl₂ 2,5 мМ, KH₂PO₄ 1,2 мМ, глюкоза 5,5 мМ, рН 7,3—7,4) при температуре 37,5°C и при постоянной аэрации смесью 95% O₂ и 5% CO₂. В течение всего эксперимента поддерживалось постоянное давление на уровне 100 мм рт.ст. Через 3 мин после начала перфузии область синоатриального узла сердца удаляли, после чего на правом предсердии размещали пару серебряных стимулирующих электродов в тефлоновой оболочке, подключенных к стимулятору ЭСЛ-2 (Россия). Изолированное сердце стимулировали до окончания эксперимента с частотой 5 Гц (300 уд./мин) при длительности импульса 2 мс и амплитуде импульса 5—7 В.

Для определения параметров механической активности сердца регистрировали развиваемое давление в полости левого желудочка (ЛЖ) при помощи подсоединенного к датчику давления катетера, проведенного через канюлю и аортальный клапан в полость ЛЖ. Скорость коронарного протока оценивали путем непрерывной регистрации количества перфузата, вытекающего из сердца. Полученные значения скорости протока выражали в мл/мин и нормировали на развиваемое давление по формуле:

$$V = (v \times 100 \text{ мм рт.ст.}) / p,$$

где:

v — ненормированная скорость протока, зарегистрированная в эксперименте;

p — амплитуда волны давления, мм рт. ст. (средняя за минуту);

100 мм рт.ст. — постоянный уровень перфузионного давления.

Необходимость нормирования скорости потока была обусловлена зависимостью этого параметра от интенсивности сократительной активности сердца, поэтому в качестве величины, по которой нормировали проток, был выбран один из параметров, характеризующих сократительную активность.

ИР повреждение создавали путем полного прекращения коронарного кровотока на 15 мин. После 10 мин реперфузии оценивали величину эндотелийзависимой дилатации коронарных сосудов по увеличению скорости потока в ответ на введение ацетилхолина (АХ) в течение 6 мин. Маточный раствор АХ (5×10^{-3} М) вводили с помощью инфузора LSP04-1A (Longerump, Китай) со скоростью, рассчитанной с учетом скорости потока перфузата, чтобы его концентрация в линии перфузии составляла 10^{-7} М.

Оценку эндотелийзависимого расслабления (ЭЗР) изолированной аорты крысы проводили после создания ИР повреждения миокарда *in situ*. Для этого на следующий день после завершения курса адаптации к гипоксии у адаптированных и контрольных крыс проводили торакотомию под уретановым наркозом (150 мг/кг) при искусственном дыхании атмосферным воздухом. После 20-минутного периода стабилизации вызывали локальную ишемию миокарда путем перевязки нисходящей ветви левой коронарной артерии на 30 мин с последующей реперфузией в течение 60 мин. Во время ИР проводилась непрерывная регистрация ЭКГ в I отведении на установке полиграф RM-6000 (Nihon Kohden, Япония). Кри-

терием ишемии служили цианоз передней стенки левого желудочка и подъем сегмента ST в первом отведении на ЭКГ, а реперфузии — развитии гиперемической реакции эпикарда.

Сразу после декапитации крыс извлекали грудную аорту и очищали ее от окружающих тканей. Затем кольцевой препарат аорты длиной 3,5 мм помещали в термостатируемую (37°C) камеру, содержащую 30 мл раствора Кребса (130 мМ NaCl, 11 мМ глюкозы, 14,9 мМ NaHCO_3 , 4,7 мМ KCl, 2,5 мМ CaCl_2 , 1,2 мМ MgSO_4 , 1,8 мМ KH_2PO_4 , pH 7,4), который постоянно аэрировали смесью 95%-ного O_2 и 5%-ного CO_2 . Исходная растягивающая нагрузка составляла 1200 мг. Период стабилизации составлял 1 ч. Силу сокращения препарата регистрировали с помощью изометрического датчика DY-1 (Ugo Basile, Италия) на регистраторе Gemini (Ugo Basile, Италия). Для оценки ЭЗР аорты предварительно вызывали сокращение аорты норадреналином (5×10^{-7} М). После выхода реакции сокращения на плато определяли максимальное ЭЗР, вызванное АХ (10^{-5} М).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica v.7.0. При оценке статистически значимых различий между группами животных использовали U-критерий Манна—Уитни и t-критерий Стьюдента. Данные усреднялись по группам и приводились как $M \pm \text{SEM}$. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Адаптация к гипоксии не влияла на величину развиваемого давления в левом желудочке ни в состоянии относительного физиологического покоя ни при ИР повреждении сердца.

На рис. 1 видно, что исходная скорость коронарного потока в изолированном сердце в контроле составляла в среднем $11,9 \pm 0,7$ мл/мин. У адаптированных животных этот показатель не изменился ($11,8 \pm 0,8$ мл/мин, $p > 0,05$). АХ вызывал сходное увеличение коронарного протока в контроле и после адаптации ($18,0 \pm 2,5$ и $23,5 \pm 7,3\%$ соответственно, $p > 0,05$). ИР повреждение приводило к нарушению эндотелийзависимой дилатации коронарных сосудов, что проявлялось в уменьшении прироста коронарного протока в ответ на АХ. Однако если в сердце неадаптированных крыс после ИР повреждения сохранялось лишь $10,4 \pm 1,7\%$ дилататорной реакции на АХ по сравнению с ответом на АХ до ИР, то после адаптации к гипоксии ИР повреждение вызвало уменьшение эндотелийзависимой дилатации коронарных сосудов только до $76,3 \pm 19,8\%$ от исходного показателя ($p < 0,05$).

Аналогичные данные были получены для ЭЗР изолированной аорты (рис. 2). Исходная величина

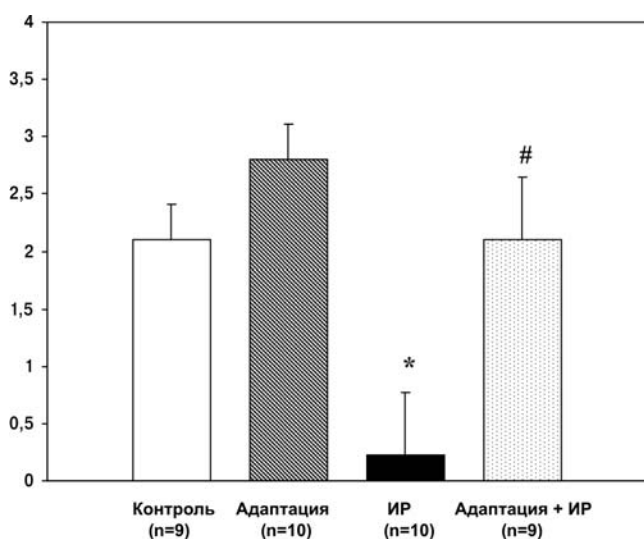


Рис. 1. Влияние адаптации к гипоксии на эндотелийзависимую дилатацию коронарных сосудов в изолированном сердце после его ишемии и реперфузии (ИР). Диаграммы показывают величину прироста коронарного протока в ответ на ацетилхолин (мл/мин).

* — статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,05$; # — статистически значимое отличие от ИР, $p < 0,05$.

ЭЗР аорты составляла $44,8 \pm 4,2\%$; ИР вызывала выраженную дисфункцию эндотелия, которая проявлялась в уменьшении реакции расслабления сосуда в ответ на АХ до $9,7 \pm 1,2$ ($p < 0,05$ по сравнению с контролем). Адаптация к гипоксии сама по себе не влияла на ЭЗР, но существенно ограничивала дисфункцию эндотелия, вызываемую ИР повреждением сердца — до $29,9 \pm 2,9\%$, что статистически значимо отличалось от показателя у неадаптированных крыс ($p < 0,05$).

Главные результаты, полученные в настоящем исследовании, состояли в том, что:

1) ИР повреждение миокарда, вызывало дисфункцию эндотелия не только коронарных, но и некоронарных сосудов, удаленных от зоны ИР повреждения;

2) адаптация к периодической нормобарической гипоксии ограничивала дисфункцию эндотелия коронарных и некоронарных сосудов, вызванную ИР повреждением.

Проблема повреждения органов, удаленных от зоны ИР, изучена мало. Тем не менее, известно, что постишемическая реперфузия сосудистого русла может приводить к активации лейкоцитов, высвобождению медиаторов воспаления и за счет этого к возникновению различных нарушений в удаленных зонах [26]. Так, например, показано, что ИР верхней брыжеечной артерии у крыс сопровождается повышением проницаемости легочных сосудов и аккумуляцией нейтрофилов [25]. При транзиторной окклюзии средней мозговой артерии наблюдалась дисфункция эндотелия брыжеечных сосудов [19]. В наших экспериментах было обнаружено, что введение в мозг крысы токсичного пептида бета-амилоида, которое приводит к интенсивному оксидативному и нитрозативному стрессу в нейронах и сосудах мозга, вызывает дисфункцию эндотелия не только церебральных сосудов, но и аорты [17].

Главным механизмом нарушения эндотелийзависимой дилатации коронарных сосудов при ИР миокарда, по-видимому, является увеличенная продукция активных форм кислорода, в первую очередь супероксида [10], а также структурное повреждение эндотелия и угнетение активности эндотелиальной NO-синтазы пероксинитритом, который в избытке формируется при взаимодействии NO и супероксида [14]. Действительно, в наших предыдущих экспериментах [2] мы наблюдали гиперпродукцию NO и накопление маркера пероксинитрита 3-нитротирозина в миокарде левого желудочка крыс при ИР повреждении. Адаптация к периодической гипоксии эффективно предупреждала оба эти явления. Это свидетельствует о том, что предупреждение гиперпродукции NO может быть одним из механизмов защитного дейст-

вия адаптации на коронарные сосуды. Однако в аорте накопление 3-нитротирозина при ИР повреждении отсутствовало. Поэтому роль этого защитного механизма адаптации в предупреждении дисфункции эндотелия некоронарных сосудов неочевидна.

Можно предположить, что наиболее вероятным повреждающим фактором в некоронарных сосудах является оксидативный стресс, который вносит огромный вклад в развитие дисфункции эндотелия и поражение сосудов при постишемической реперфузии [5]. ИР повреждение миокарда сопровождается выделением большого количества цитокинов, в частности фактора некроза опухолей α (TNF- α) [10] и других факторов, стимулирующих продукцию свободных радикалов, которые, в свою очередь, вызывают дисфункцию коронарного эндотелия [10]. Эти факторы, образуемые в миокарде при ИР, могут переноситься с током крови в отдаленные, некоронарные сосуды, вызывая там оксидативный стресс и повреждения, аналогичные повреждениям коронарных сосудов [29]. Важно учесть, что ишемические повреждения миокарда сопровождаются активацией адренергической системы и выбросом катехоламинов, также вызывающих выход провоспалительных цитокинов и активацию свободнорадикальных процессов. Роль оксидативного стресса в ИР поражении некоронарных сосудов подтверждается тем, что как дисфункцию, так и структурные повреждения эндотелия брыжеечных сосудов при ИР повреждении миокарда удавалось предупредить с помощью антиоксидантов [29].

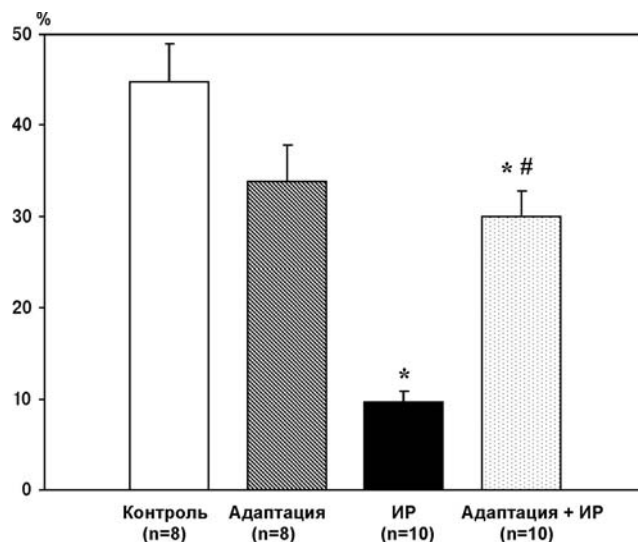


Рис. 2. Влияние ишемического и реперфузионного (ИР) повреждения миокарда *in situ* и адаптации к гипоксии на эндотелийзависимое расслабление изолированной аорты. Диаграммы показывают величину расслабления аорты в процентах от величины сокращения, вызванного норадреналином.

* — статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,05$; # — статистически значимое отличие от ИР, $p < 0,05$.

Адаптация к гипоксии обладает способностью повышать уровень антиоксидантной защиты, в частности, за счет индукции ключевых антиоксидантных ферментов — супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы [6]. Этот защитный эффект вносит важный вклад в защиту сердца при ИР повреждении [30]. Ограничение оксидативного стресса также способствует повышению биодоступности NO в сосудах и сохранению нормальной функции эндотелия [12].

Хорошо известно, что толерантность сердца к ИР повреждению можно повысить с помощью ишемического или гипоксического прекондиционирования [22]. Адаптация к периодической гипо- или нормобарической гипоксии обладает аналогичным кардиопротекторным эффектом; она способна ограничивать размер инфаркта миокарда [1, 21, 31], постишемические нарушения сократительной функции [20] и аритмии [1, 31]. Преимущество адаптации к гипоксии состоит в том, что ее защитные эффекты сохраняются дольше, чем эффекты прекондиционирования [7, 21], при этом практически не вызывая побочных эффектов [28]. В настоящей работе впервые было продемонстрировано, что адаптация к гипоксии обладает не только кардиопротекторным, но и вазопротекторным эффектом при ИР повреждении миокарда и при этом эффективно защищает как коронарные, так и некоронарные сосуды. Механизмы этого вазопротекторного эффекта требуют дальнейших исследований.

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

Список литературы

1. **Белкина Л.М., Смирнова Е.А., Шимкович М.В.** и др. Кардиопротекторный эффект адаптации к периодической нормобарической гипоксии у крыс // Патол. физиол. и эксперим. терапия. — 2012 (в печати).
2. **Горячева А.В., Белкина Л.М., Терехина О.Л.** и др. Роль предупреждения гиперпродукции оксида азота в кардиопротекторном эффекте адаптации к периодической гипоксии // Патол. физиол. эксперим. терапия. — 2012. — №1. — С. 23–28.
3. **Машина С.Ю., Александрин В.В., Горячева А.В.** и др. Адаптация к гипоксии предупреждает нарушения мозгового кровообращения при нейродегенеративном повреждении: роль оксида азота // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 2006. — Т. 142, №8. — С. 132–135.
4. **Машина С.Ю., Смирин Б.В., Покидышев Д.А.** и др. Роль предупреждения дефицита оксида азота в антигипертензивном эффекте адаптации к гипоксии // Известия РАН. Серия биологическая. — 2001. — №5. — С. 579–587.
5. **Andreadou I., Iliodromitis E.K., Farmakis D., Kremastinos D.T.** To prevent, protect and save the ischemic heart: antioxidants revisited // Expert Opin. Ther. Targets. — 2009. — Vol. 13. — P. 945–956.
6. **Asha Devi S., Subramanyam M.V., Vani R., Jeevaratnam K.** Adaptations of the antioxidant system in erythrocytes of trained adult rats: impact of intermittent hypobaric-hypoxia at two altitudes // Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. — 2005. — Vol. 140. — P. 59–67.
7. **Cai Z., Manalo D.J., Wei G.** et al. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury // Circulation. — 2003. — Vol. 108. — P. 79–85.
8. **Carrasco-Martin C., Alonso-Orgaz S., De la Pinta J.C.** et al. Endothelial hypoxic preconditioning in rat hypoxic isolated aortic segments // Exp. Physiol. — 2005. — Vol. 90. — P. 557–569.
9. **Ehrenbourg I.V., Gorbachenkov A.A.** Interval hypoxic training in ischemic heart disease // Hyp. Med. J. — 1993. — №1. — P. 13–16.
10. **Gao X., Zhang H., Belmadani S.** et al. Role of TNF-alpha-induced reactive oxygen species in endothelial dysfunction during reperfusion injury // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. — 2008. — Vol. 295. — H2242–H2249.
11. **Jabs A., Fasola F., Muxel S.** et al. Ischemic and non-ischemic preconditioning: Endothelium-focused translation into clinical practice // Clin. Hemorheol. Microcirc. — 2010. — Vol. 45. — P. 185–191.
12. **Jugdutt B.I.** Nitric oxide and cardioprotection during ischemia-reperfusion // Heart Fail. Rev. — 2002. — Vol. 7. — P. 391–405.
13. **Kolar F., Ostadal B.** Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia // Physiol. Res. — 2004. — Vol. 53. — S3–S13.
14. **Kurzelewski M., Czarnowska E., Beresewicz A.** Superoxide- and nitric oxide-derived species mediate endothelial dysfunction, endothelial glycocalyx disruption, and enhanced neutrophil adhesion in the post-ischemic guinea-pig heart // J. Physiol. Pharmacol. — 2005. — Vol. 56. — P. 163–178.
15. **Lyamina N.P.** Changes in plasma β -endorphine in patients with coronary heart disease exposed to psychoemotional load and under the influence of adaptation to hypoxia // Hypoxia Medical J. — 1995. — №2. — P. 17–18.
16. **Manukhina E.B., Downey H.F., Lyamina S.V., Lyamina N.P.** Beneficial effects of adaptation to hypoxia in patients with ischemic heart disease and extrasystolic arrhythmias // J. Mol. Cell. Cardiol. — 2007. — Vol. 42. — Suppl. 1. — P. S9.
17. **Manukhina E.B., Goryacheva A.V., Pshennikova M.G.** et al. Protective effects of adaptation to hypoxia in experimental Alzheimer's disease // Intermittent Hypoxia and Human Disease / Ed. by Xi L., Serebrovskaya T.V. — London: Springer-Verlag, 2012. — P. 155–171.
18. **Manukhina E.B., Jasti D., Vanin A.F., Downey H.F.** Intermittent hypoxia conditioning prevents endothelial dysfunction and improves nitric oxide storage in spontaneously hypertensive rats // Exp. Biol. Med. — 2011. — Vol. 236. — P. 867–873.
19. **Martinez-Revelles S., Jimenez-Altayo F., Caracuel L.** et al. Endothelial dysfunction in rat mesenteric resistance artery after transient middle cerebral artery occlusion // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 2008. — Vol. 325. — P. 363–369.
20. **Milano G., Corno A.F., Lippa S.** et al. Chronic and intermittent hypoxia induce different degrees of myocardial tolerance to hypoxia-induced dysfunction // Exp. Biol. Med. — 2008. — Vol. 227. — P. 389–397.
21. **Neckar J., Ostadal B., Kolar F.** Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery // Physiol. Res. — 2004. — Vol. 53. — P. 621–628.

22. *Ong S.G., Hausenloy D.J.* // Pharmacol. Ther. — 2012. — Vol. 136. — P. 69–81.
23. *Perkins K.A., Pershad S., Chen Q.* et al. The effects of modulating eNOS activity and coupling in ischemia/reperfusion (I/R) // Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. — 2012. — Vol. 385. — P. 27–38.
24. *Seal J.B., Gewertz B.L.* Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury // Ann. Vasc. Surg. — 2005. — Vol. 19. — P. 572–584.
25. *Souza D.G., Cassali G.D., Poole S., Teixeira M.M.* Effects of inhibition of PDE4 and TNF- α on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury // Br. J. Pharmacol. — 2001. — Vol. 134. — P. 985–994.
26. *Souza D.G., Coutinho S.F., Silveira M.R.* et al. Effects of a BLT receptor antagonist on local and remote reperfusion injuries after transient ischemia of the superior mesenteric artery in rats // Eur. J. Pharmacol. — 2000. — Vol. 403. — P. 121–128.
27. *Wang Z.H., Chen Y.X., Zhang C.M.* et al. Intermittent hypobaric hypoxia improves postischemic recovery of myocardial contractile function via redox signaling during early reperfusion // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. — 2011. — Vol. 301. — H1695–1705.
28. *Xu W.Q., Yu Z., Xie Y.* et al. Therapeutic effect of intermittent hypobaric hypoxia on myocardial infarction in rats // Basic Res. Cardiol. — 2011. — Vol. 106. — P. 329–342.
29. *Zhao M., He X., Wier W.G.* et al. Endothelial dysfunction in rat mesenteric artery after regional cardiac ischemia-reperfusion // Exp. Physiol. — 2012. — Vol. 97. — P. 70–79.
30. *Zhu W.Z., Dong J.W., Ding H.L.* et al. Postnatal development in intermittent hypoxia enhances resistance to myocardial ischemia/reperfusion in male rats // Eur. J. Appl. Physiol. — 2004. — Vol. 91. — P. 716–722.
31. *Zong P., Setty S., Sun W.* et al. Intermittent hypoxic training protects canine myocardium from infarction // Exp. Biol. Med. — 2004. — Vol. 229. — P. 806–812.

Поступила 15.11.12

Сведения об авторах:

Терехина О.Л., науч. сотр. лаб. патофизиологии кровообращения, ФГБУ «НИИОПП» РАМН
 Белкина Л.М., д-р биол. наук, профессор, зав. лаб. патофизиологии кровообращения, ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН
 Абрамочкин Д.В., канд. биол. наук, младш. науч. сотр. каф. физиологии человека и животных, биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова
 Буданова О.П., старш. науч. сотр. лаб. стресса и адаптации, ФГБУ «НИИОПП» РАМН
 Машина С.Ю., канд. биол. наук, старш. науч. сотр. лаб. регуляторных механизмов адаптации ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН
 Смирин Б.В., канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. регуляторных механизмов адаптации ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН
 Якунина Е.Б., младш. науч. сотр. лаб. регуляторных механизмов адаптации, ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН
 Дауни Г.Ф. (Downey H.F.), профессор Отдела интегративной физиологии Центра медицинских наук Университета Северного Техаса, г.Форт-Уэрт, США

Е.Н. Кравчук¹, Е.Н. Гринева¹, М.М. Галагудза^{1,2}, А.А. Байрамов¹

Влияние метформина на устойчивость миокарда к ишемии у крыс с неонатальным стрептозотоциновым сахарным диабетом 2-го типа

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова Минздрава России, 197341, Санкт-Петербург, ул. Акkuratова, 2

² Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава России, 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8

На модели глобальной ишемии-реперфузии изолированного сердца крысы изучены эффекты предварительного введения метформина на устойчивость миокарда к ишемии у животных с неонатальным стрептозотоциновым сахарным диабетом 2 типа (СД2). Метформин не оказывал достоверного эффекта на размер инфаркта у здоровых животных и животных с СД2. В то же время, размер инфаркта при СД2 был существенно ниже, чем в контроле, что является подтверждением феномена метаболического прекондиционирования. Использованный протокол введения метформина не обеспечивает достоверного кардиопротективного эффекта у животных с СД2.

Ключевые слова: метформин, сахарный диабет 2 типа, сердце, ишемия, реперфузия, инфаркт миокарда

E.N. Kravchuk¹, E.N. Grineva¹, M.M. Galagudza^{1,2}, A.A. Bairamov¹

The effect of metformin on myocardial tolerance to ischemia in rats with Diabetes mellitus type 2

¹ Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., St. Petersburg, 197341, Russia

² I.P. Pavlov State Medical University, 6/9, Lva Tolstogo street, St. Petersburg, 197089, Russia

The effect of metformin on myocardial sensitivity to ischemia in rats with neonatal streptozotocin T2DM was investigated using the model of global ischemia-reperfusion in the isolated perfused heart. Metformin administration had no effect on infarct size. At the same time, infarct size in T2DM was significantly lower than in controls, which is indicative of the phenomenon of metabolic preconditioning in T2DM. The protocol of metformin administration used in this study had not afforded a significant cardioprotective effect in animals with T2DM.

Key words: diabetes mellitus type 2, biguanides, metformin, infarct size, metabolic preconditioning

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является ведущей причиной смерти у пациентов с сахарным диабетом 2 типа (СД2) [8], в связи с чем в настоящее время ведется активный поиск фармакологических препаратов, влияющих не только на уровень гликемии, но и на сердечно-сосудистый прогноз у пациентов с сочетанием СД2 и ИБС. В последние годы показано, что наиболее часто применяемый препарат из группы бигуанидов метформин, кроме основного сахароснижающего эффекта, обладает другими плейотропными эффектами: противоишемическим действием [5, 6, 14], положительным влиянием на гемореологию [11, 12], липидный спектр крови [12].

Механизмы снижения риска развития сердечно-сосудистых осложнений под действием бигуанидов остаются малоизученными. В некоторых исследованиях были показаны вазопротективные эффекты метформина [4, 13]. Единичные работы посвящены оценке возможного кардиопротективного действия метформина, в том числе у животных с сахарным диабетом 1 типа (СД1) и СД2 [6, 10, 14]. Тем не менее, на сегодняшний день практически не изучен вопрос о том, оказывает ли метформин инфаркт-лимитирующий эффект при регулярном парентеральном введении у животных с СД2.

Цель исследования — изучение инфаркт-лимитирующего эффекта метформина у крыс с СД2 и здоровых животных, на модели глобальной ишемии-реперфузии изолированного сердца при интраперитонеальном введении препарата.

Для корреспонденции: Кравчук Екатерина Никодимовна, аспирант ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» Минздрава России. E-mail: kravchuke@rambler.ru

Методика

Модель сахарного диабета 2 типа. В данной работе использовали модель неонатального стрептозотоцинового СД₂, индуцированного однократной внутривентриальной инъекцией стрептозотоцина в дозе 65 мг/кг, растворенного в цитратном буфере (рН 5,5), на 3—4 сут. жизни крысам линии Wistar [1]. Перфузию изолированного сердца проводили через 10—12 нед. после индукции СД₂.

Перфузия изолированного сердца [3] и моделирование инфаркта. Наркоз осуществлялся уретаном в дозе 1200 мг/кг внутривентриально. После торакотомии сердце извлекали из грудной полости и подключали к модифицированному аппарату Лангендорфа (ООО «Кардиопротект», Санкт-Петербург). Перфузию осуществляли ретроградно через аорту оксигенированным буфером Кребса—Хенселейта под постоянным давлением 80 мм рт. ст. В течение всего эксперимента температура сердца и буфера поддерживалась на уровне 37°C. После 15-минутного периода стабилизации моделировали инфаркт миокарда путем создания 30-минутной глобальной ишемии с последующей 120-минутной реперфузией.

Протокол эксперимента включал 4 группы животных:

1. Контроль (К) (n = 13): здоровые крысы, получавшие инъекции физиологического раствора в течение 3 сут. перед проведением эксперимента.

2. Контроль + метформин (КМ) (n = 12): здоровые крысы, получавшие интраперитонеально метформин (Глюкофаж, Nусomed) в дозе 200 мг/кг в течение 3 сут. перед экспериментом.

3. СД₂ (n = 12): крысы с развившимся СД₂, получавшие инъекции 0,9% физиологического раствора в течение 3 сут. перед экспериментом.

4. СД₂ + метформин (СД₂М) (n = 7): крысы с развившимся СД₂, получавшие метформин по той же схеме, что и в группе КМ.

Методика определения размера инфаркта. Размер инфаркта определяли планиметрическим методом после 15-минутной инкубации срезов сердца в 1%-ном растворе трифенилтетразолия хлорида (ТТХ) при 37°C. Окрашенные срезы фотографировали цифровой камерой Olympus, сопряженной со стереомикроскопом МБС-10 (ЛОМО, Санкт-Петербург). Площадь ТТХ-негативных зон, а также общую площадь каждого среза вычисляли с использованием программы PhotoShop 6.0. Размер инфаркта выражали в процентах от общей площади среза и вычисляли среднее значение для данного сердца.

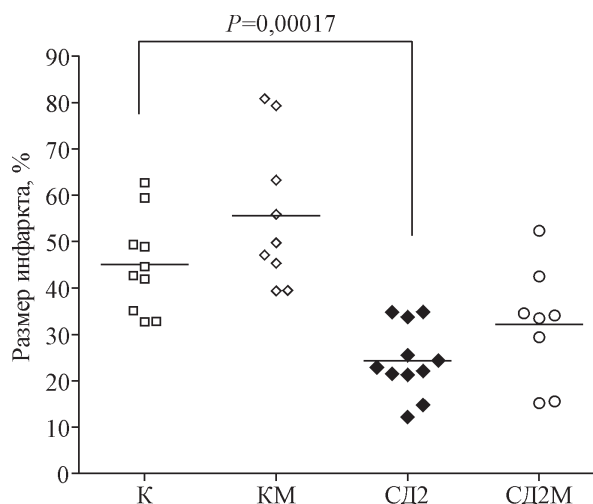
Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью программного пакета SPSS 12.0.RU for Windows. Значимость различий показателей оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни для независимых выборок. Показатели представлены в виде «среднее ± стандартное отклонение». Различия расценивались как статистически значимые при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Масса животных и уровень гликемии в экспериментальных группах. В контрольной группе масса животных на момент выполнения перфузии сердца составила 187 ± 32 г, а в группе с СД₂ она была значимо ниже и составляла 145 ± 13 г. Уровень гликемии в венозной крови перед выполнением перфузии сердца в группах К, КМ, СД₂ и СД₂М составил соответственно $6,0 \pm 0,6$; $6,4 \pm 0,6$; $9,5 \pm 3,3$ ($p < 0,05$ в сравнении с К) и $8,2 \pm 1,6$ ммоль/л. В группе СД₂М на фоне введения метформина не произошло значимого снижения уровня гликемии, что, вероятно, связано с малой продолжительностью терапии.

Размер зоны инфаркта. Данные по размеру инфаркта в различных группах приведены на рисунке. В контроле размер инфаркта составил $45,0 \pm 10,4\%$. Введение здоровым животным метформина не приводило к уменьшению размера инфаркта ($55,6 \pm 15,8\%$). При этом у животных с верифицированным СД₂ размер инфаркта был существенно меньше, чем в контроле ($24,4 \pm 7,6\%$, $p < 0,001$). Терапия метформином не приводила к значимому увеличению или уменьшению размера инфаркта у животных с СД₂ ($37,7 \pm 8,3\%$).

Ранее при оценке влияния однократного введения метформина на выраженность ишемического повреждения миокарда *in vivo* у здоровых мышшей и мышшей с генетической моделью СД₂ было показано уменьшение ишемического повреждения миокарда при отсутствии влияния метформина на уровень гликемии [6]. На модели изолированного сердца здоровых крыс также изучались



Размер зоны инфаркта в экспериментальных группах значимо меньше в группах СД₂ и СД₂М по сравнению с группами К и КМ.

К — группа контроля; КМ — группа контроля, получавшая терапию метформином; СД₂ — группа с сахарным диабетом 2 типа; СД₂М — группа с сахарным диабетом 2 типа, получавшая терапию метформином.

острые эффекты метформина, причем препарат вводился непосредственно в левый желудочек до и после кратковременной глобальной ишемии [10]. При этом были получены положительные эффекты в виде существенного повышения коронарного потока и менее выраженного снижения ударного объема по сравнению с контролем.

Хроническое пероральное введение метформина в течение 6 недель в возрастающей концентрации животным с индуцированным СД1 оказывало сахароснижающий эффект и, кроме того, приводило к улучшению ослабленного при СД1 сократительного ответа миокарда на увеличение преднагрузки [14].

Результаты данной работы свидетельствуют о том, что в использованных дозировке, пути введения и сроке терапии метформин не оказывал кардиопротективного эффекта как при экспериментальном СД2, так и при его отсутствии. С другой стороны, в исследовании подтверждено существование феномена метаболического прекодиционирования (МПК) [7, 9], развивающегося при СД1 и СД2 у крыс и проявляющегося в парадоксальном повышении устойчивости миокарда к ишемическому повреждению [2]. В качестве возможных механизмов МПК рассматриваются активация АТФ-чувствительных калиевых каналов кардиомиоцитов, снижение интенсивности гликолиза и изменения функции сарколеммальных ионных каналов.

Принципиальная возможность ограничения острого ишемического-реперфузионного повреждения миокарда под действием метформина требует дальнейшего уточнения с учетом таких факторов, как продолжительность ишемии, дозировка метформина, протокол его введения.

Работа выполнена в научно-исследовательской лаборатории метаболизма миокарда Института экспериментальной медицины ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» Минздрава России.

Список литературы

1. **Багров Я.Ю., Манусова Н.Б.** и др. Эндогенный ингибитор альфа-1 Na/K-АТФазы маринобуфагенин — новый фактор патогенеза сахарного диабета // Докл. акад. наук. — 2005. — Т. 404, №3. — С. 333—337.
2. **Галагудза М.М., Некрасова М.К., Сыренский А.В., Нифонтов Е.М.** Устойчивость миокарда к ишемии и эффек-

тивность ишемического прекодиционирования при экспериментальном сахарном диабете // Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. — 2006. — Т. 92, №3. — С. 284—291.

3. **Минаян С.М., Галагудза М.М.** и др. Методика перфузии изолированного сердца крысы // Рег. кров. и микроцирк. — 2009. — Т. 8, №4. — С. 54—59.

4. **Bhalla R.C., Toth K.F., Tan E.** et al. Vascular Effects of Metformin Possible Mechanisms for Its Antihypertensive Action in the Spontaneously Hypertensive Rat // Am. J. Hypertens. — 1996. — Vol. 9, №6. — P. 570—576.

5. **Bhamra G.S., Hausenloy D.J., Davidson S.M.** et al. Metformin protects the ischemic heart by the Akt-mediated inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening // Basic Res. Cardiol. — 2008. — Vol. 103, №3. — P. 274—284.

6. **Calvert J.W., Gundewar S., Jha S.** et al. Acute Metformin Therapy Confers Cardioprotection Against Myocardial Infarction Via AMPK-eNOS-Mediated Signaling // Diabetes. — 2008. — Vol. 57, №3. — P. 696—705.

7. **Hardie D.G., Carling D., Carlson M.** The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? // Annu. Rev. Biochem. — 1998. — Vol. 67. — P. 821—855.

8. **Hurst R.T., Lee R.W.** Increased incidence of coronary atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus: mechanisms and management // Ann. Intern. Med. — 2003. — Vol. 139, №10. — P. 824—834.

9. **Kemp B.E., Stapleton D., Campbell D.J.** et al. AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator // Biochem. Soc. Trans. — 2003. — Vol. 31. — P. 162—168.

10. **Legtenberg R.J., Houston R.J., Oeseburg B., Smits P.** Metformin improves cardiac functional recovery after ischemia in rats // Horm. Metab. Res. — 2002. — Vol. 34, №4. — P. 182—185.

11. **Muller S., Denet S., Candiloros H.** et al. Action of metformin on erythrocyte membrane fluidity in vitro and in vivo // Eur. J. Pharmacol. — 1997. — Vol. 337, №1. — P. 103—110.

12. **Nagi D.K., Yudkin J.S.** Effects of metformin on insulin resistance, risk factors for cardiovascular disease, and plasminogen activator inhibitor in NIDDM subjects. A study of two ethnic groups // Diabetes care. — 1993. — Vol. 16, №4. — P. 621—629.

13. **Sartoretto J.L., Melo G.A., Carvalho M.H.** et al. Metformin treatment restores the altered microvascular reactivity in neonatal streptozotocin-induced diabetic rats increasing NOS activity, but not NOS expression // Life Sci. — 2005. — Vol. 77, №21. — P. 2676—2689.

14. **Verma S., McNeill J.H.** Metformin improves cardiac function in isolated streptozotocin-diabetic rat hearts // Am. J. Physiol. — 1994. — Vol. 266. — P. 714—719.

Поступила 24.09.12

Сведения об авторах:

Гринева Елена Николаевна, д-р мед. наук, рук. Института эндокринологии ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» Минздрава России

Галагудза Михаил Михайлович, д-р мед. наук, рук. Института экспериментальной медицины ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, проф. каф. патофизиологии ГОУ ВПО «СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова»

Байрамов Алекбер Азизович, д-р мед. наук, зав. лаб. клинической эндокринологии с группой нейроэндокринологии Института эндокринологии ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» Минздрава России

М.А. Лебедева^{1,2}, Ю.С. Медведева¹, Р.С. Мирзоян²,
Д.В. Масленников², Н.Н. Золотов², М.Ю. Карганов^{1,3}

Интегральная оценка сдвигов в сывороточном гомеостазе при экспериментальном инфаркте миокарда

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, д.8

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова» РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, д.8

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, Ленинский просп., 33

Изучали динамические изменения в сывороточном гомеостазе крыс при развитии экспериментального инфаркта миокарда с помощью метода лазерной корреляционной спектроскопии. Наличие некротического повреждения миокарда подтверждали электрокардиографическими, гистологическими и биохимическими методами. Обнаружено повышение вклада в светорассеяние мелких частиц в остром периоде инфаркта миокарда, свидетельствующее о накоплении в сыровотке продуктов катаболизма и изменении уровня отдельных белков. Сравнение субфракционного состава сыровотки крови крыс с различной степенью проникновения некроза в глубину миокарда выявило преобладание частиц низкомолекулярной фракции (до 10 нм) у животных с трансмуральным инфарктом и среднемолекулярной фракции (50–120 нм) у животных с нетрансмуральным инфарктом. Эти результаты согласуются с клиническими данными, полученными с помощью данного метода на пациентах с инфарктом миокарда с наличием патологического зубца Q на ЭКГ или без него.

Ключевые слова: экспериментальный инфаркт миокарда, лактатдегидрогеназа, лазерная корреляционная спектроскопия, гомеостаз

M.A. Lebedeva^{1,2}, U.S. Medvedeva¹, R.S. Mirzoyan²,
D.V. Maslennikov², N.N. Zolotov², M.Yu. Karganov^{1,3}

Integrated assessment of serum homeostasis shifts in experimental myocardial infarction

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

² SF Institute of Pharmacology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

³ A.N. Bach Institute of Biochemistry of the RAS, Leninsky prospekt, 33, build. 2, Moscow, 119071, Russia

Dynamic changes in serum homeostasis of rats with experimental myocardial infarction evolution using the method of laser correlation spectroscopy were studied. The presence of necrotic myocardial damage was confirmed by electrocardiographic, histological and biochemical methods. Increased contribution of small particles in the acute period of myocardial infarction was detected, which indicates products of catabolism accumulation in serum and changing the level of some proteins. Comparison of subfractional content of sera from rats with varying degrees of extension of myocardial necrosis through the ventricular wall revealed the predominance of particles of low molecular size (up to 10 nm) in animals with transmural infarction and middle-size fraction (50–120 nm) in animals with non-transmural infarction. These results are consistent with the clinical data obtained by this method in patients with Q-wave and non-Q-wave myocardial infarction.

Key words: experimental myocardial infarction, lactate dehydrogenase, laser correlation spectroscopy, homeostasis

Оценка параметров гомеостаза биологических жидкостей наиболее показательна при определении тяжести патологических состояний, дифференциальной диагностике и проведении экспертизы эффективности лечения [1].

Для корреспонденции: Лебедева Марина Андреевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. полисистемных исследований ФГБУ «НИИ ОПП» РАМН. E-mail: labpolys@gmail.com

Метод лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) позволяет оценивать жидкие нативные биологические среды с учетом межмолекулярных взаимодействий и взаимного влияния отдельных их компонентов. Результатом исследования биологических жидкостей методом ЛКС является информация о распределении частиц по их размерам (субфракционный состав) или о молекулярно-массовом распределении.

Изменение физиологического состояния организма приводит к изменению метаболических процессов, что, в свою очередь, ведет к изменению состава биологических жидкостей [2]. Так, преобладание низкомолекулярной фракции свидетельствует о накоплении в сыворотке крови продуктов катаболизма, сдвиг в сторону высокомолекулярной фракции свидетельствует об образовании крупных полимерных комплексов. Преобладание среднемолекулярной фракции свидетельствует об изменении белкового обмена и обмена липидов [5]. Таким образом, будучи неспецифическим, метод ЛКС дает общее представление о сдвиге метаболических и обменных процессов в организме в ту или иную сторону. Это позволяет применять его для дифференциальной диагностики различных патологических процессов в комплексе с традиционно используемыми методами.

Метод ЛКС был успешно применен для оценки тяжести заболевания и эффективности лечения при бронхиальной астме, сахарном диабете, анемии и ряде других заболеваний [3, 6, 8, 10]. Высокая чувствительность этого метода, превышающая диагностическую значимость измерения уровня тропонина I, установлена у больных с острым инфарктом миокарда [12]. Острый инфаркт миокарда (ИМ) приводит к развитию каскада биохимических, нейрогуморальных и иммунных процессов, которые происходят как в самой сердечной мышце, так и на системном уровне. При некрозе миокарда развивается асептическое воспаление, которое проявляется активацией цитокинов, образованием аутоантител, перестройкой клеточного звена иммунитета.

Цитокины стимулируют синтез белков острой фазы воспаления: С-реактивного белка, амилоидного А белка сыворотки, фибриногена, гаптоглобина и др. При развитии острого ИМ в сыворотку крови попадают белки, которые могут выполнять роль маркеров в диагностике миокардиального повреждения: тропонин, лактатдегидрогеназа, креатинкиназа и другие [15]. Концентрационная чувствительность ЛКС относительно белка составляет менее 1 мкг/мл, что намного превышает разрешающую способность любого фотометрического метода. Метод позволяет определять размеры частиц от 1 до 10000 нм, находящихся в любой биологической жидкости.

Цель исследования — оценка направленности изменений в сывороточном гомеостазе при развитии экспериментального ИМ у крыс.

Методика

Эксперименты проведены на 46 белых беспородных крысах-самцах массой 190—200 г. Экспериментальный ИМ у крыс моделировали путем необратимой окклюзии нисходящей ветви левой коронарной артерии [16], ложнопериорированным животным лигатуру не перевязывали [4]. Степень повреждения миокарда оценивали по динамике изменений ЭКГ и выраженности

гистологических изменений на 3, 14 сут. после оперативного вмешательства. Забор крови у крыс проводили из хвостовой вены через 3 и 14 сут. после окклюзии нисходящей ветви левой коронарной артерии.

Для регистрации ЭКГ использовали компьютерный электрокардиограф «Полиспектр-8/В» (Нейрософт, Россия). Кроме того, в качестве биохимического маркера для диагностики развития миокардиального некроза оценивали уровень активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Все определения активности ЛДГ в сыворотке крови крыс проводили в кинетическом режиме в пластиковых 1-см кюветках (Brand, ФРГ) при длине волны 340 нм на спектрофотометре DU-50 (Beckman-Coulter, США). Для определения ЛДГ использовали 10 мкл сыворотки крови и по 500 мкл раствора НАД, пирофосфатного буфера и раствора молочной кислоты. Время реакции составляло 20 мин при 37°C.

На 3- и 14-е сут. животных выводили из эксперимента путем передозировки эфирного наркоза, извлекали сердце для гистологического исследования. Материал фиксировали в 10%-ном водном растворе нейтрального формалина с дальнейшей заливкой в парафин и изготовлением серийных поперечных срезов толщиной 5 мкм на микротоме МНС-2 по общепринятым методикам.

Срезы выполнены на расстоянии 4 мм от верхушки сердца и окрашены для обзорных целей гематоксилином и эозином, для оценки степени ишемии миокарда — по Ли: гематоксилином — основным фуксином — пикриновой кислотой (ГОФП-методом) и для оценки соединительнотканного рубца на месте инфаркта — по Массону.

Весь материал исследовали с использованием биологического микроскопа ScienOp BP-20 при увеличении окуляров 7х, 10х и объективов 4х, 10х и 40х. Фотографировали цифровой камерой-окуляр для микроскопа DCM500 (500 pixels, USB2.0).

Субфракционный состав сыворотки крови регистрировали, используя лазерный корреляционный спектрометр ЛКС-03-«ИНТОКС», утвержденный Комитетом по новой медицинской технике МЗ РФ для определения размеров микрочастиц в биологических жидкостях (Сертификат RU.C. 39.003.A N 5381). Сыворотку крови крыс в объеме 0,18 мл заливали в кювету ЛК-спектрометра. Измерение проводили в частотном диапазоне 16 384 кГц в количестве 2000 накоплений. Регуляризацию спектра проводили с использованием нелинейной шкалы (программы «Spectrometer» входящей в программное обеспечение спектрометра). Результатом расчета при таком способе обработки является гистограмма, по оси ординат которой отложен процентный вклад частиц в светорассеяние, а по оси абсцисс — их размер (радиус) в нанометрах.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

1. Электрокардиография

Изменения на ЭКГ оценивали по наиболее информативному для крыс II стандартному отведению. На 3 сут. после окклюзии во II стандартном отведении ЭКГ наблюдали признаки некротического повреждения миокарда: глубокий зубец Q (рис. 1, А) или комплекс QS (рис. 1, Б). Глубокий зубец Q сохранялся в большинстве случаев и на 14-е сут. развития инфаркта.

2. Гистология

Гистологически на 3-и сут. в группе животных после перенесенной окклюзии коронарной артерии в миокарде левого желудочка наблюдали отчетливый коагуляционный некроз кардиомиоцитов в виде одного крупного размера очага с четкими границами (рис. 2, А). Цитоплазма кардиомиоцитов в очаге некроза гомогенная, светло-розового цвета, ядра в состоянии кариолизиса, часть клеток фрагментирована. Вокруг очага некроза наблюдали демаркационное воспаление. Пучки мышечных волокон в этом участке истончены, наблюдается выраженный отек стромы с лейкоцитарной инфильтрацией. В миокарде видны признаки диссоциации, фрагментации и волнообразной деформации мышечных волокон миокарда, что может быть следствием нарушения ритма сердца. В срезах представлены крупные и мелкие коронарные артерии и вены в состоянии резкого полнокровия.

При окраске ГОФП — методом на всей площади срезов наблюдается тотальная выраженная фуксинофилия цитоплазмы сохранившихся кардиомиоцитов (рис. 2, Б). При окраске по Массону обнаружена картина острого ИМ в период ярких некротических изменений.

На 14-е сут. после коронарной окклюзии окраска по Массону подтверждает картину ИМ в стадии рубцевания: крупные участки миокарда замещены созревающей рыхлой неоформленной соединительной тканью. Морфология кардиомиоцитов характеризуется выраженной белковой зернистой дистрофией и субтотальной умеренно-выраженной гипертрофией, сохраняются небольшие очаги некротизированных кардиомиоцитов.

На рис. 3. представлены наиболее показательные поперечные срезы сердец ложнопериорированных животных и крыс, подвергшихся перевязке коронарной артерии. Видно, что у крыс опытной группы к 14 сут. после операции практически вся стенка левого желудочка сердца в зоне рубца была представлена соединительной тканью. Отмечается гипертрофия миокарда и увеличение объема полостей желудочков.

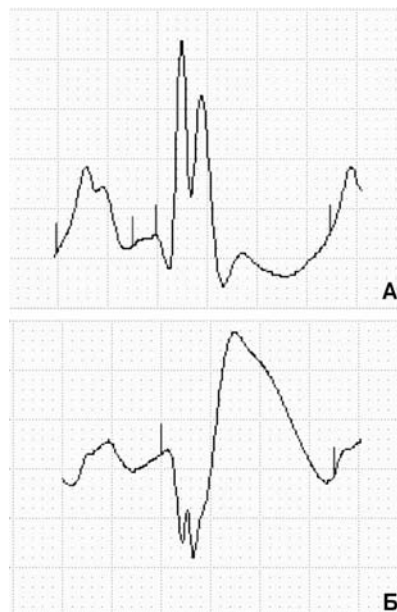


Рис. 1. Электрокардиографические признаки некротического повреждения миокарда.

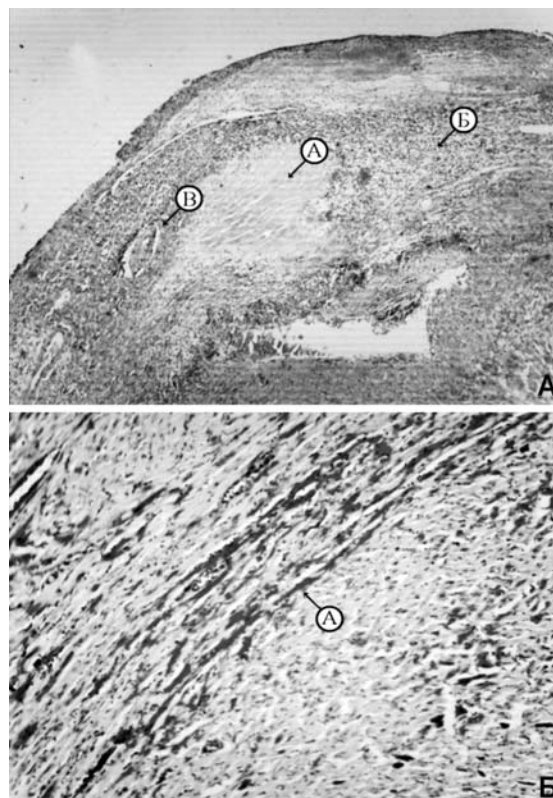


Рис. 2. Гистологический срез участка инфаркта миокарда в некротической стадии: 3-и сут. после окклюзии:

А — окраска гематоксилином и эозином: а — участок некроза кардиомиоцитов; б — выраженная лейкоцитарная инфильтрация; в — артерия. Об.4 x Ок.10.

Б — окраска ГОФП — методом: а — выраженная фуксинофилия кардиомиоцитов. Об.10 x Ок.10.

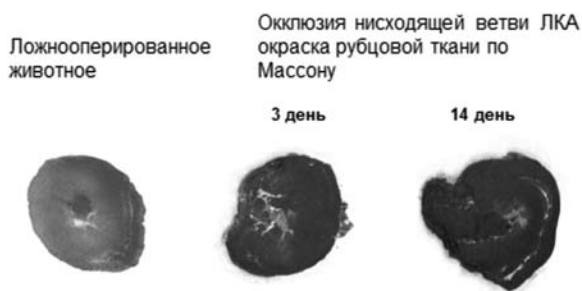


Рис. 3. Морфологическая картина развития трансмурального инфаркта миокарда после окклюзии нисходящей ветви левой коронарной артерии.

3. Активность лактатдегидрогеназы

Исследование общей активности ЛДГ характеризует интенсивность окислительно-восстановительных процессов организма, а определение активности отдельных изоэнзимов ЛДГ способствует диагностике некоторых заболеваний сердца, печени и других органов.

При ИМ общая активность сывороточной ЛДГ увеличивается через 8—12 ч после начала развития заболевания, достигает максимума через 24—48 ч и остается повышенной на протяжении 7 сут. и более. Активность сывороточной лактатдегидрогеназы при ИМ дольше сохраняется повышенной, чем активность других ферментов. Ценность определения данного фермента особенно велика в неясных случаях заболевания, при нетипичной клинической и электрокардиографической картине [14]. Наиболее часто встречается трех- или четырехкратное повышение уровня активности фермента.

В наших исследованиях мы получили увеличение уровня общей активности сывороточной ЛДГ на 3-и сут. в группе ложнооперированных животных и животных с развившимся экспериментальным ИМ по сравнению с интактными животными. Значение активности ЛДГ в

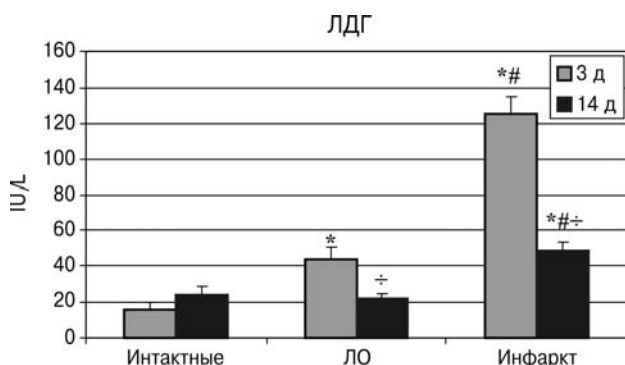


Рис. 4. Уровень общей активности ЛДГ в сыворотке крови интактных, ложнооперированных животных и животных с экспериментальным инфарктом миокарда:

* — отличие от группы интактные, $p < 0,001$; # — отличие от группы ложнооперированные, $p < 0,001$ (критерий Манна—Уитни); † — сравнение на 3-и и 14-е сут., $p < 0,05$ (критерий Вилкоксона).

группе с необратимой окклюзией левой коронарной артерии составило 125,6 у.е./л, что в 2,8 раза превышала общую активность фермента в группе ложнооперированных животных — 43,8 у.е./л. Это может отражать вклад сердечного изофермента ЛДГ в общий количественный показатель активности данного фермента (рис. 4).

4. Лазерная корреляционная спектроскопия

Использование метода лазерной корреляционной спектроскопии для оценки общего направления изменений в сывороточном гомеостазе при развитии экспериментального ИМ у крыс позволило выявить следующие факты.

Обнаружено, что для гистограмм сыворотки крови крыс можно выделить три основных интервала:

- 1 — от 0 до 20,58 нм;
- 2 — от 20,58 до 300,41 нм;
- 3 — свыше 300,41 нм.

На 3-и сут. после окклюзии статистические различия между группами наблюдали только в зоне 1, где зафиксировано увеличение вклада в светорассеяние мелких частиц менее 15 нм у групп ложнооперированных животных и животных с экспериментальным ИМ по сравнению с интактными животными. При этом ложнооперированная группа и группа с ИМ отличаются между собой только в точке 2,56 нм. Возможно, таким образом, проявляются отличия в сдвигах, обусловленные общей воспалительной реакцией после оперативного вмешательства у крыс обеих групп, от последствий ишемического некроза миокарда у животных с экспериментальным ИМ. Также заметна тенденция к уменьшению вклада в светорассеяние частиц 2-й зоны и увеличение вклада в 3-й зоне в оперированных группах по сравнению с контрольной (рис. 5 А).

Приведенные данные лишь отчасти сопоставимы с результатами, полученными при исследовании сывороток крови пациентов с острым ИМ, поскольку последним проводили терапию с момента поступления в клинику. Тем не менее, выявленное у них аналогичное повышение вклада в светорассеяние частиц менее 70 нм в первые часы и сутки после начала заболевания [7, 12] воспроизведено в наших опытах на животных.

На 14-е сут. наблюдали сходное перераспределение частиц: увеличение вклада в светорассеяние в 1-й зоне, и уже статистически значимое увеличение вклада в 3-й зоне и уменьшение во 2-й у ложнооперированной группы и группы с ИМ по сравнению с контролем (рис. 5 Б).

Зная величину молекулярной массы лактатдегидрогеназы (144 кДа), миоглобина (16—20 кДа), тропонинов (18, 24, 37 кДа), белка, связывающего жирные кислоты (15 кДа) и исходя из строения белка как идеальной сферы, размеры (радиус) таких органических соединений находятся в пределах 1,5—3,5 нм [13].

Однако, учитывая реальную структуру белковых молекул и наличие гидратной оболочки, можно полагать, что радиус Стокса этих молекул не превышает 10 нм. Можно предположить, что увеличение вклада мелких частиц в ЛК-спектры, отражает повышение уровня этих белков в крови при миокардиальном некрозе.

После первой недели лечения пациентов с ИМ наблюдали увеличение вклада в светорассеяние частиц средних размеров [11]. Из рис. 5 видно, что в отсутствии терапии у экспериментальных животных этот эффект не зафиксирован. Было также показано, что использование тромболитической терапии у больных острым ИМ сопровождалось увеличением вклада в ЛК-спектры частиц с гидродинамическим радиусом более 150 нм.

У пациентов с ИМ в первые часы после инфаркта выявлены различия в субфракционном составе сыворотки крови в зависимости от типа развития заболевания: в сыворотке пациентов с глубоким патологическим зубцом Q преобладали частицы размером <10 нм [9], а у пациентов с ИМ без зубца Q в сыворотке преобладали частицы размером — >150 нм [11]. Из данных, приведенных на рис. 6, видно, что сходная картина наблюдается при сравнении ЛК-спектров экспериментальных групп животных с подтвержденным гистологическими методами трансмуральным и нетрансмуральным ИМ.

Таким образом, экспериментальный ИМ у крыс приводит к возникновению каскада биохимических и иммунных реакций, итогом которых являются воспалительные, дистрофические, катаболические и некротические процессы. Электрокардиографические изменения желудочкового комплекса, гистологические исследования и повышение уровня сывороточной активности ЛДГ отражают процесс формирования очагового некроза миокарда с последующим рубцеванием и развитием постинфарктного кардиосклероза. Увеличение вклада в светорассеяние мелких частиц, изменение соотношения частиц среднемoleкулярной фракции свидетельствуют о накоплении в сыворотке крови продуктов катаболизма, увеличении уровня отдельных сывороточных белков, нарушении обменных процессов.

Изменения в субфракционном составе сыворотки крови у животных с экспериментальным ИМ сходны с таковыми у пациентов с подтвержденным в клинике диагнозом ИМ. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности использования ЛКС в качестве дополнительного к общепринятым методам диагностики ИМ в эксперименте и клинике. Этот метод можно также использовать в качестве критерия риска развития осложнений при острой сердечной недостаточности, для прогноза при нарушениях кровоснабжения миокарда и для оценки эффективности проводимой терапии.

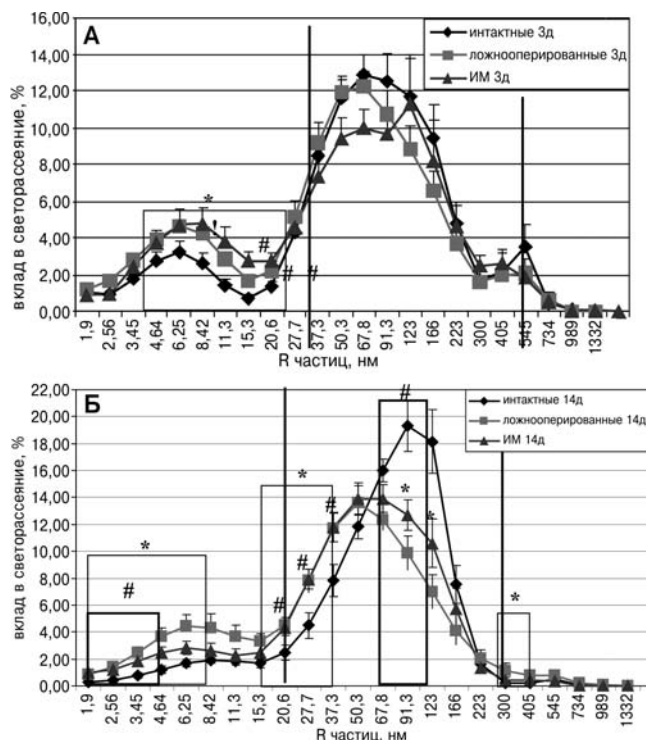


Рис. 5. ЛК-спектры сыворотки крыс: А — на 3-и сут. после окклюзии; Б — ЛК-спектры крыс на 14-е сут. после окклюзии. * — сравнение интактной группы с ложнооперированной группой, $p < 0,05$; # — сравнение интактной группы с инфарктом, $p < 0,05$ (критерий Манна—Уитни).

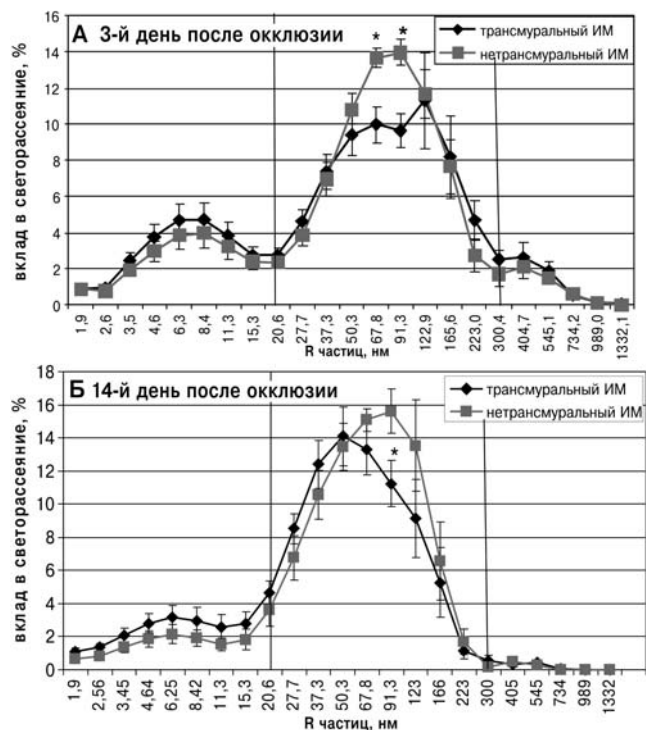


Рис. 6. Отличия ЛКС-спектров трансмурального ИМ и нетрансмурального ИМ: А — 3-и сут. после окклюзии; Б — 14-е сут. после окклюзии. * — сравнение трансмурального ИМ и нетрансмурального ИМ (критерий Манна—Уитни).

Список литературы

1. *Аклев А.В., Пашков И.А., Клопов Н.В., Лебедев А.Д., Силина А.Г., Павлов М.Ю., Носкин Л.А.* Дифференциальные возможности метода ЛКС при диагностике различных патологических процессов, встречаемых среди населения Уральского радиационного следа // Радиационная биология. Радиоэкол. — 1995. — Т. 35, №6. — С. 829—835.
2. *Алещенко А.В., Алчинова И.Б., Дмитриева О.С., Дмитриева Г.П., Карганов М.Ю., Кожевникова М.И., Носкин Л.А., Серебряный А.М., Хлебникова Н.Н., Пелевина И.И.* Использование цитогенетического метода исследования буккального эпителия и метода лазерной корреляционной спектроскопии для мониторинга нарушений в организме детей // Цитология. — 2006. — Т. 48, №2. — С. 169—172.
3. *Архипова Е.Н., Дедаев С.И., Алчинова И.Б., Чернов А.Б., Goldenberg L., Карганов М.Ю.* Исследование взаимодействия наночастиц диоксида титана и сыворотки крови больных аутоиммунными заболеваниями // Патогенез. — 2011. — №1. — С. 67—70.
4. *Гнездилова А.В., Ганьшина Т.С., Мирзоян Р.С., Лебедева М.А.* Мексидол и сочетанная сосудистая патология мозга и сердца // Экспер. и клин. Фармакология. — 2011. — Т. 74, №6. — С. 20—23.
5. *Карганов М.Ю., Макаров Р.В., Щеголев А.А., Спиридонова Е.А., Пасько В.Г., Самигулина Г.Р., Алчинова И.Б., Архипова Е.Н., Лыхин В.Н.* Перспективы использования метода лазерной корреляционной спектроскопии в клинической практике // Тромбоз, гемостаз и реология. — 2012. — №1. — С. 20—26.
6. *Ковалева О.И., Ушаков А.А., Лебедева М.А., Хлебникова Н.Н., Горбунова Н.А., Карганов М.Ю.* Новые подходы к ранней диагностике заболеваний системы крови // Кремлевская медицина. — 2004. — 3. — С. 11—13.
7. *Ковальчук Ю.П., Носкин Л.А., Ланда С.Б., Бажора Ю.И., Поляков А.У., Хижняк Е.В.* Экспресс-диагностика urgentных состояний по оценке гомеостаза методом лазерной корреляционной спектроскопии // Клинико-лабораторный консилиум. — 2005. — №7. — С. 21—23.
8. *Пирузян Л.А., Ковалев И.Е., Ковалева В.Л., Тюменцева Е.С., Карганов М.Ю., Балаболкин И.И., Ковалева О.И., Румянцева Е.И.* Лазерная корреляционная спектроскопия макромолекулярных комплексов в сыво-

ротке крови как эффективный метод оценки течения заболевания бронхиальной астмой у детей // Докл. Академии наук. — 2004. — Т. 395, №6. — С. 832—836.

9. *Поляков А.У., Хижняк Е.В.* Субфракционный состав сыворотки крови у больных с инфарктом миокарда // Врачебная практика. — 2004. — №4. — С. 26—29.

10. *Румянцева Е.И., Ковалев И.Е., Ковалева О.И., Карганов М.Ю.* Лазерная корреляционная спектроскопия макромолекулярных комплексов как эффективный метод выявления передозировки инсулина и коррекции инсулинотерапии при сахарном диабете у детей // Докл. Академии наук. — 2005. — Т. 402, №3. — С. 1—4.

11. *Хижняк Е.В.* Диагностическая и прогностическая значимость исследования субфракционного состава сыворотки крови у больных с острым инфарктом миокарда: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — Харьков, 2008.

12. *Хижняк Е.В.* Оценка риска развития осложнений у больных с острым инфарктом миокарда на основании исследования субфракционного состава сыворотки крови посредством лазерной корреляционной спектроскопии в сравнении с определением тропонина I // Медицина неотложных состояний. — 2008. — №4. — С. 60—64.

13. *Erickson H.P.* Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy // Biological Procedures Online. — 2009. — Vol. 11, №1. — P. 32—51. DOI: 10.1007/s12575-009-9008-x.

14. *Giju S., Putz M.V., Chiriak A.* On specific vs. non specific enzymic inter-activity in acute myocardial infarction // Digest Journal of Nanomaterials and biostructures. — 2010. — Vol. 5, №1. — P. 567—574.

15. *Rosalki S.B., Roberts R., Katus H.A., Giannitis T., Ladenson J.H.* Cardiac biomarkers for detection of myocardial infarction: perspectives from past to present // Clinical Chemistry, 2004. — Vol. 50, 11. — P. 2205—2213.

16. *Seropian I.M., Gonzalez G.E.* Experimental Myocardial Infarction // Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat / Ed. A. Rigalli, V.E. Di Loreto. — CRC Press. — P. 201—205.

Поступила 18.09.13

Сведения об авторах:

Медведева Юлия Сергеевна, мл. науч. сотр., лаб. полисистемных исследований ФГБУ «НИИ ОПП» РАМН
Мирзоян Рубен Симонович, д-р биол. наук, проф., рук. лаб. цереброваскулярных расстройств ФГБУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» РАМН

Масленников Денис Вадимович, мл. науч. сотр. лаб. цереброваскулярных расстройств ФГБУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» РАМН;

Золотов Николай Николаевич, д-р биол. наук, проф. главн. науч. сотр. лаб. психофармакологии ФГБУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» РАМН

Карганов Михаил Юрьевич, д-р биол. наук, проф. рук. лаб. полисистемных исследований ФГБУ «НИИ ОПП» РАМН

А.В. Иванов¹, А.А. Московцев^{1,2}, Е.А. Мартынова¹, Г.Д. Савина², Б.П. Лузянин¹, А.А. Кубатиев¹

Общие аминотиолы плазмы крови крыс при внутрибрюшинном и подкожном введении гомоцистеина

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

² Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия последиplomного образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123836, Москва, ул. Баррикадная, 2/1

В настоящей работе показаны изменения общего содержания основных аминотиолов плазмы крови (цистеина, глутатиона, цистеинилглицина и гомоцистеина) крыс при моделировании гипергомоцистеинемии путем ежедневного внутрибрюшинного (0,6 мкмоль/г массы тела) и подкожного (0,12 мкмоль/г массы тела) введения гомоцистеина. За две недели внутрибрюшинного введения наблюдался значительный рост содержания цистеина (с ~40 до 180 мкМ) и повышение уровня глутатиона (с 10–15 до 30 мкМ) и цистеинилглицина (с 1,5 до 4,5 мкМ), а также падение уровня гомоцистеина с 300 до 200–250 мкМ на 2-й неделе эксперимента. Изменения содержания общих аминотиолов при подкожном введении носили подобный характер, но были менее выражены. В данном случае наблюдался стабильный уровень гомоцистеина (~70 мкМ) и повышение цистеина до 60 мкМ на 2-й неделе. Эти данные отражают дозозависимые процессы адаптации организма к условиям гипергомоцистеинемии, заключающиеся в способности к усиленному метаболизму гомоцистеина, сохраняя низкий, но коррелирующий со степенью и длительностью гипергомоцистеинемии, уровень глутатиона.

Ключевые слова: аминотиолы, гомоцистеин, цистеин, цистеинилглицин, глутатион, ДТНБ, ВЭЖХ, гомоцистеинемия

A.V. Ivanov¹, A.A. Moskovtsev^{1,2}, E.A. Martynova¹, G.D. Savina², B.P. Luzyanin¹, A.A. Kubatiev¹

Total aminothiols of rat plasma under intraperitoneal and subcutaneous introduction of Homocysteine

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

² Russian medical academy of postdegree education, 2/1, Barrikadnaya st., 123836, Moscow, Russia

In the presented work a variation of total aminothiols (cysteine, glutathione, cysteinylglycine and homocysteine) in blood plasma have been shown at modelling hyperhomocysteinemia by daily intraperitoneal (0.6 mkmol/g body weight) and subcutaneous (0.12 mkmol/g body weight) introduction of homocysteine. During two weeks of the intraperitoneal introduction a significant concentration growth (from ~40 to 180 mkM) of cysteine was observed. We also observed a moderate change of concentration levels for glutathione (from 10–15 to 30 mkM) and cysteinylglycine (from 1,5 to 4,5 mkM). The homocysteine level has decreased from 300 to 200–250 mkM at second week of experiments. Experimental results with subcutaneous introduction were similar. In this case a stable homocysteine level (~70 mkM) and increase of cysteine level (to 60 mkM) was observed at second week. These data reflect dose-depended processes of organism adaptation to hyperhomocysteinemia, i.e. reinforced capability for homocysteine metabolism and at the same time retention low glutathione level which correlates with hyperhomocysteinemia degree and duration.

Key words: aminothiols, homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, glutathione, DTNB, HPLC, hyperhomocysteinemia

Состояние гипергомоцистеинемии (ГГЦ), т.е. повышенного уровня гомоцистеина в плазме крови, является независимым фактором риска осложнений многих сердечно-сосудистых заболеваний [2]. Для экспериментального моделирования ГГЦ у животных применяются различные подходы [6, 10, 14], которые можно разбить

на две группы: метионин- и гомоцистеинопосредованные ГГЦ в зависимости от того, какую аминокислоту вводят животному или включают в его рацион. Метионин является предшественником гомоцистеина (ГЦис) и в процессе своего превращения отдает метильную группу в ходе реакций так называемого метионинового цикла [5]. Поэтому метаболические эффекты при введении метионина и ГЦис наряду с общими чертами несут в себе и отличия [12]. Также немаловажную роль играют

Для корреспонденции: Иванов Александр Владимирович, науч. сотр. лаб. функциональной протеомики и метабомики ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: ivanov_av82@mail.ru

генетические и возрастные метаболические особенности животного [1]. Показано, что на метиониновой диете у молодых крыс, в отличие от взрослых, не возникает ГГЦ и не наблюдается гипометилирования ДНК [13]. В данной работе мы индуцировали ГГЦ путем внутрибрюшного и подкожного введения Гцис молодым крысам (7 недель в начале эксперимента). Определение концентрации общего аминокислотного профиля плазмы крови проводили методом обращено-фазовой ВЭЖХ с УФ-детектированием, используя химическую дериватизацию дитиобиснитробензойной кислотой (ДТНБ) [9].

Цель работы — изучение изменений аминокислотного профиля плазмы крови при экспериментальной гипергомоцистенемии.

Методика

Оборудование. Хроматограф Perkin Elmer series 200 (двухканальный градиентный насос, дегазатор, термостат колонок, петлевой инжектор 100 мкл, УФ-детектор и АЦП NCI 900), центрифуга Elmi CM-50, вакуумный концентратор Eppendorf Concentrator plus, термошейкер Eppendorf Thermomixer compact, деионизатор воды Millipore Simplicity 185 с картрижем Simprakor 1.

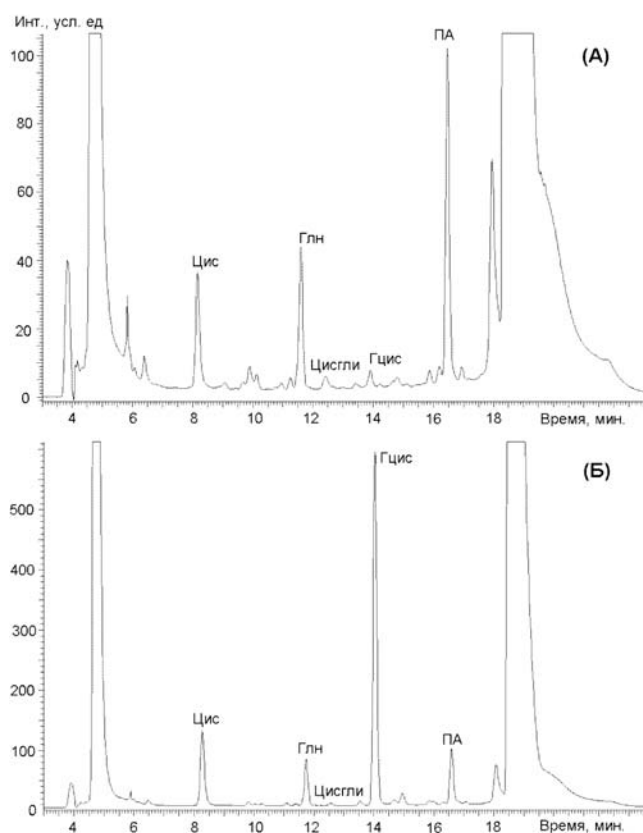


Рис. 1. Хроматограммы: А — образец плазмы крови интактной крысы; Б — после внутрибрюшинного введения Гцис

Реактивы. Ацетонитрил Криохром сорт 0; муравьиная кислота (Fluka) для ВЭЖХ-МС; ДТНБ (Sigma); этанол-ректификат 96,3%; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 98—100,5% (Panreac); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 98—101% (Panreac); D-пеницилламин (ПА) от Sigma; DL-Дитиотреитол >99,5% (ДТТ) от Fluka; L-цистеин 97% (Цис) от Aldrich, цистеинилглицин >85% (Цисгли) от Sigma; глутатион 99% (Глн) от Sigma-Aldrich; DL-гомоцистеин >95% (Sigma); трифторуксусная кислота 99% (ТФУ) от Sigma-Aldrich.

Работа с животными. Самцы крыс линии Вистар возрастом 7 нед. Все крысы были распределены на 3 экспериментальные группы по 5 животных в каждой. В 1-й группе крыс гомотиостеин вводили внутривнутрибрюшинно, во 2-й — подкожно, из расчета 0,6 и 0,12 мкмоль гомотиостеина на 1 г массы тела соответственно, один раз в день. Животным контрольных групп вводили соответствующий объем физиологического раствора.

Раствор D,L-гомотиостеина для инъекций готовили на стерильном физиологическом растворе. Длительность введения гомотиостеина определялась кинетикой развития ответа на стресс, ранее уточненной в ходе предварительно проведенных экспериментов, в которых было установлено, что пик острого ответа приходился на 4-е — 5-е сут. На 4-е, 9-е и 14-е сут. эксперимента через 1 ч после введения раствора Гцис часть крыс декапитировали гильотиной согласно требованиям международных правил работы с животными, взята кровь, которую центрифугировали на скорости 200 г в течение 10 мин.

Пробоподготовка. Кровь крысы центрифугировали при 3000 г 3 мин и отбирали плазму крови. К 200 мкл плазмы добавляли по 40 мкл 0,25 мМ ПА (внутренний стандарт); 100 мМ ДТТ; воды/калибровочного раствора и 80 мкл 0,2 М Na-фосфатного буфера с pH 7,4. Смесь инкубировали 10 мин при 60°C. Затем добавляли 400 мкл EtOH и 400 мкл 50 мМ ДТНБ в EtOH, инкубировали 10 мин при 24°C, после 30 мин при 4°C и центрифугировали 10 мин при 15000 г. Супернатант (400 мкл) отбирали и испаряли досуха под вакуумом ~3 ч при 60°C. Высушенный образец растворяли в воде (334 мкл) и центрифугировали 15 с при 10000 г для осаждения нерастворимого остатка.

ВЭЖХ. Для разделения компонентов использовали две, соединенные последовательно колонки (Agilent Eclipse XDB-C18 150 мм*4,6 мм /5 мкм и Agilent Hypersil BDS-C18 150 мм*4,6 мм /5 мкм). Температуру колонок поддерживали на уровне 35°C, а элюентов на уровне 24°C. Объем инъекции составлял 100 мкл (полное заполнение петли инжектора).

Поток — 0,75 мл/мин. Элюент А: 0,04% ТФУ в 0,2 М Na-фосфатном буфере рН 6,6; Элюент Б: ацетонитрил. Элюция происходила при прямом градиенте Б от 3,5 до 10% за 12 мин, промывка колонок 2,5 мин 60% Б, после линейное снижение Б от 60 до 3,5% за 1 мин и регенерация колонок 12 мин 3,5% Б. Сигнал определяли по поглощению при 330 нм.

Обработка данных. Первичную обработку (интегрирование хроматографических пиков) осуществляли в TotalChrom v.6.2, построение калибровочных графиков в Microsoft Excel 1997. Для определения концентрации аминоктиолов использовали соотношение площади пика аналита к площади пика внутреннего стандарта. Калибровку сигнала проводили путем анализа образцов плазмы с добавлением известного количества аналитов и регрессионного анализа.

Результаты и обсуждение

Временные рамки эксперимента были обусловлены ранее полученными собственными данными о скорости ответа на стресс в виде экспрессии белков теплового шока в печени, согласно которым, пик острого ответа приходился на 4—5-е сут.

На рис. 1 приведены примеры хроматограмм плазмы крови после обработки ДТНБ. Время выхода производного Цис составляло 8,1 мин, Глн — 11,6 мин, Цисгли — 12,5 мин, Гцис — 13,9 мин, ПА — 16,5 мин. У группы интактных животных наблюдались следующие показатели: Цис — 18—40 мкМ, Гцис — 1,1—2,4 мкМ, Глн — 12—18 мкМ, Цисгли — 2—2,8 мкМ. При этом в ходе эксперимента наблюдалась тенденция к увеличению содержания аналитов в плазме крови.

При внутрибрюшинном введении Гцис наблюдается значительное возрастание концентрации общего цистеина до 140—180 мкМ (рис. 2А), при этом эффект наиболее выражен на 9-е и 14-е сут. введения Гцис. При подкожном введении также наблюдается повышение уровня общего Цис, но в меньшей степени (~70 мкМ на 14-е сут. введения). При введении Гцис как подкожно, так и внутрибрюшинно концентрация его в плазме крови существенно возрастает до 30—40 и 200—300 мкМ соответственно (рис. 2Б). При этом в последнем случае наблюдается временное снижение уровня Гцис. Эти данные указывают на то, что в организме животных происходит активация

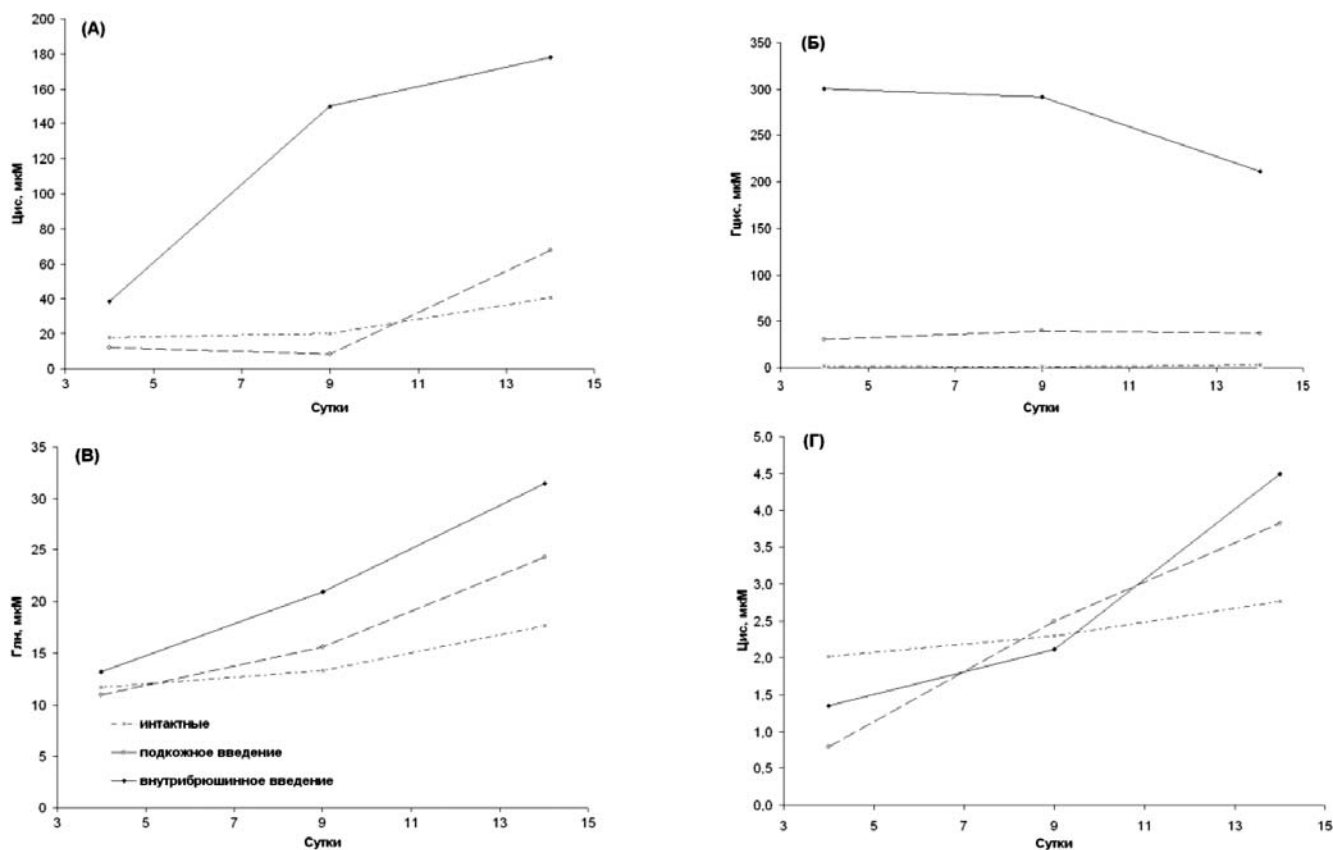


Рис. 2. Аминоктиолы плазмы крови при внутрибрюшинном и подкожном введении Гцис: А — цистеин; Б — гомоцистеин; В — глутатион; Г — цистеинилглицин

адаптационных механизмов регуляции метаболизма Гцис, направленных на снижение его содержания. Существует несколько путей утилизации Гцис внутри клетки: реметилование до метионина с помощью метионинсинтазы или бетаин-гомоцистеин метилтрансферазы (в печени), а также деметилование по цистатион- β -синтазному пути, приводящее к образованию Цис. К_M этих ферментов распределены таким образом, что в нормальных условиях преобладает реметилование, а при повышении внутриклеточной концентрации деметилование [7]. Также в утилизации Гцис у крыс играет роль почечная экскреция [8], однако оценить её вклад в данном дизайне эксперимента не представлялось возможным. Таким образом, эффект снижения концентрации Гцис при одновременном возрастании общего Цис, по всей видимости, обусловлен работой цистатион- β -синтазного пути, при этом основная активность наблюдается в печени [7].

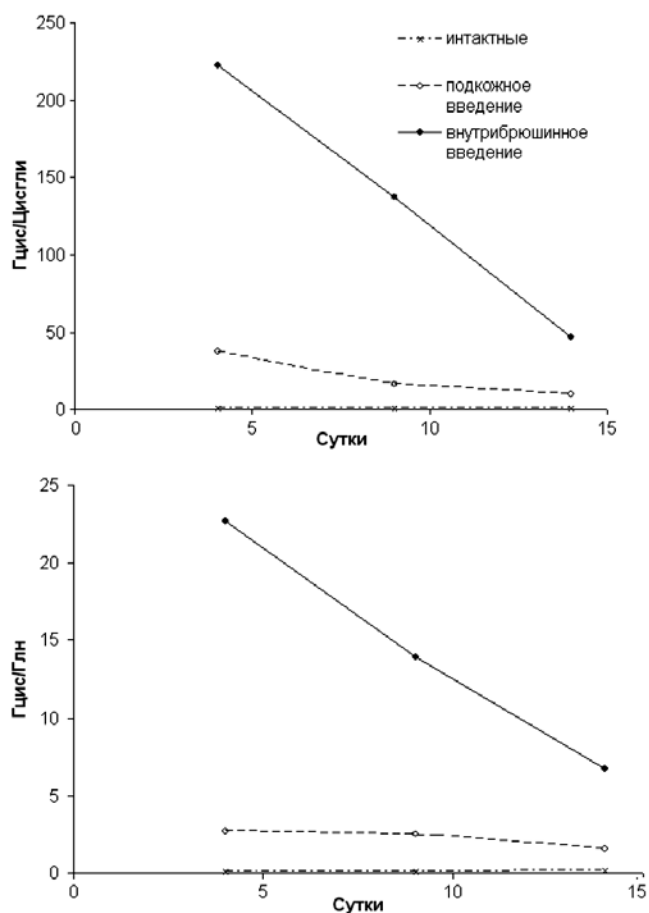


Рис. 3. Изменения соотношений гомоцистеина к цистеинилглицину и глутатиону при моделировании ГЦ

Изменения общего Глн (рис. 2В) и Цисгли (рис. 2Г) имеют менее выраженный характер, однако за 14 сут. эксперимента наблюдалась увеличение концентрации этих метаболитов на 35—80% по сравнению с интактными животными. Интересно отметить, что соотношение Гцис/Глн и Гцис/Цисгли при внутрибрюшинном введении имело характер линейного снижения (рис. 3). Поскольку Цис является лимитирующим звеном в синтезе Глн, увеличение концентрации аминокислоты должно приводить к соответствующему повышению продукта его синтеза. Однако, наблюдаемый эффект роста метаболитов Цис значительно меньше, что можно объяснить множеством звеньев регуляции содержания Глн, поддерживающих его гомеостаз. Основным местом синтеза Глн является печень, на неё же падает основная нагрузка по деметилованию Гцис. Лимитирующим звеном тут является внутриклеточная концентрация Цис, активность глутамил-цистеин лигазы, которую ингибирует глутатион как конкурент глутамин. Уровень Глн в плазме также определяется активностями внеклеточных ферментов — γ -глутамилтрансферазы (ГГТ) и цистеинилглицин дипептидазы. ГГТ служит для глутаминирования аминокислот (в том числе Цис) что является одним из путей их внутриклеточного транспорта. Конечным продуктом распада Глн является Цис, т.е. лимитирующее звено его внутриклеточного синтеза. Таким образом, Цис через отрицательную обратную связь является регулятором своего внутриклеточного захвата и его накопление в условиях гомоцистеинемии должно было вызывать возрастание уровня Цисгли и Глн в плазме. Однако на синтез Глн влияет и транспорт Цис через ASC-систему [11], которая в условиях тяжелой гипергомоцистеинемии может работать преимущественно на выброс Цис из клетки. В плазме крови Цис находится преимущественно в окисленном состоянии, связываясь с белками, образуя цистин и смешанные дисульфиды. Цистин транспортируется в клетки посредством Xc⁻ [11] системы, при этом обмениваясь на глутамат [3], который также необходим для синтеза Глн. Разница в концентрациях глутамата внутри и вне клетки является движущей силой этого процесса, поэтому при повышении плазменного глутамата (а также гомоцистеиновой кислоты) захват цистина ингибируется и синтез Глн снижается [4]. Таким образом, можно предположить, что гомеостаз Глн в данном случае обеспечивается регуляцией транспорта Цис между клетками и внеклеточной средой.

Полученные результаты указывают на адаптационные возможности организма утилизировать Гцис в условиях искусственно поддерживаемой гомоцистеинемии, сохраняя при этом уровень глутатиона на низком, но коррелирующем с дозой и длительностью введения Гцис, уровне.

Список литературы

1. **Пшенникова М.Г.** Устойчивость к повреждающим воздействиям и защитные эффекты адаптации у животных разных генетических линий // Патогенез. — 2012. — 10(1). — С. 20—26.
2. **Родионов Р.Н., Ленц С.Р.** Современные представления о гипергомоцистеинемии как факторе риска сердечно-сосудистых заболеваний // Артериальная гипертензия. — 2008. — 14(1). — С. 110—115.
3. **Bannai S.** Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts // J. Biol. Chem. — 1986. — Vol. 261. — P. 2256—2263.
4. **Bannai S., Takada A., Kasuga H., Tateishi N.** Induction of cystine transport activity in isolated rat hepatocytes by sulfobromophthalein and other electrophilic agents // Hepatology. — 1986. — 6. — P. 1361—1368.
5. **Bjorke Monsen A.L., Ueland P.M.** Homocysteine and methylmalonic acid in diagnosis and risk assessment from infancy to adolescence // Am. J. Clin. Nutr. — 2003. — Vol. 78. — P. 7—21.
6. **Chen C., Surowiec S.M., Morsy A.H., Ma M.** Intraoperative infusion of homocysteine increases intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid arteries // Atherosclerosis. — 2002. — Vol. 160(1). — P. 103—114.
7. **Finkelstein J.D.** Methionine metabolism in mammals // J. Nutr. Biochem. — 1990. — 1. — P. 228—237.
8. **Friedman A.N., Bostom A.G., Selhub J.** et al. The kidney and homocysteine metabolism // J. Am. Soc. Nephrol. — 2001. — 12. — P. 2181—2189.
9. **Katrusiak A.E., Paterson P.G., Kamencic H., Shoker A., Lyon A.W.** Pre-column derivatization high-performance liquid chromatographic method for determination of cysteine, cysteinyl-glycine, homocysteine and glutathione in plasma and cell extracts // J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. — 2001. — Vol. 758(2). — P. 207—212.
10. **Korokin M.V., Pokrovskiy M.V., Novikov O.O.** et al. A model of hyperhomocysteine-induced endothelial dysfunction in rats // Bull. Exp. Biol. Med. — 2011. — Vol. 152(2). — P. 213—215.
11. **Lu S.C.** Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies // FASEB J. — 1999. — Vol. 13(10). — P. 1169—1183.
12. **Pexa A., Boeger R.H., Henle T.** et al. Effects of moderate hyperhomocysteinaemia induced by 4 weeks methionine-enriched diet on metabolite profile and mesenteric artery function in rats // Br. J. Nutr. — 2008. — Vol. 99(5). — P. 993—999.
13. **Pogribny I.P., Prizmirska T.V., Kulik G.I.** et al. Age-related effects of methionine-enriched diet on plasma homocysteine concentration and methylation of hepatic DNA in rats // Ukr. Biokhim. Zh. — 2005. — Vol. 77(4). — P. 114—119.
14. **Robin S., Courderot-Masuyer C., Nicod L.** et al. Opposite effect of methionine-supplemented diet, a model of hyperhomocysteinemia, on plasma and liver antioxidant status in normotensive and spontaneously hypertensive rats // J. Nutr. Biochem. — 2004. — Vol. 15(2). — P. 80—89.

Поступила 10.06.13

Сведения об авторах:

Мартынова Елена Александровна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. тромбозиса и тромбогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Московцев Алексей Александрович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. тромбозиса и тромбогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН, доцент каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО «РМАПО» Минздрава РФ

Савина Галина Дмитриевна

Лузянин Борис Петрович, д-р хим. наук, проф., зав. лаб. функциональной протеомики и метаболомики ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Аслан Амирханович Кубатиев, акад. РАМН, проф., директор ФГБУ «НИИОПП» РАМН, зав. каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО «РМАПО» Минздрава РФ

В.А. Ахмедов¹, В.Т. Долгих¹, Д.В. Наумов², Н.А. Нечипоренко²

Участие матриксной металлопротеиназы-9 и тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы-1 в механизмах формирования пароксизмов фибрилляции предсердий у больных с метаболическим синдромом

¹ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Омская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 644043, Омск, ул. Ленина, 12

² Негосударственное учреждение здравоохранения «Отделенческая клиническая больница на станции Омск-Пассажирский ОАО РЖД», 644099, Омск, ул. Карбышева, 41

Цель исследования: изучить патогенетическое значение активности ММП-9, ТИМП-1, а также полиморфизма генов ангиотензиногена 1 Thr 174 Met, ангиотензиногена 2 Met 235 Thr и аполипопротеина С3 С3238 G у мужчин с метаболическим синдромом в сочетании с пароксизмальной формой фибрилляции предсердий в отношении формирования пароксизмов. *Материалы и методы.* Обследовано 60 мужчин с метаболическим синдромом в сочетании с пароксизмальной формой фибрилляции предсердий. У всех больных методом иммуноферментного анализа исследовались сывороточная концентрация матриксной металлопротеиназы-9 и тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы-1, а также полиморфизма генов. *Результаты исследования.* У мужчин, страдающих метаболическим синдромом с сочетанием с пароксизмальной формой фибрилляции предсердий, выявлено увеличение сывороточной концентрации ММП-9, может приводить к увеличению частоты и продолжительности пароксизмов фибрилляции за счёт увеличения содержания коллагена как в гипертрофированном миокарде, так и в сосудистой стенке. Кроме того выявлено достоверное преобладание мутации ангиотензиногена 2 Met 235 Thr в сравнении с больными артериальной гипертензией, фибрилляцией предсердий и нормальной массой тела.

Ключевые слова: метаболический синдром, ММП-9, ТИМП-1, полиморфизм генов

V.A. Akhmedov¹, V.T. Dolgikh¹, D.V. Naumov², N.A. Nechiporenko²

The participation of matrix metalloproteinases-9 and TIMP-1 in formation of atrial fibrillation paroxysms in patients with metabolic syndrome

¹ Omsk state medical academy, 12, Lenina str., Omsk, 644043, Russia

² Clinical Hospital of Omsk Passazhirsky station, 41, Karbyshev str., Omsk, 644099, Russia

The aim of this study was to estimate the role of matrix metalloproteinases activity (MMP-9, TIMP-1) and gene polymorphism at the patients with metabolic syndrome in combination with paroxysmal form of atrial fibrillation. The 60 patients with metabolic syndrome in combination with paroxysmal form of atrial fibrillation were investigated with estimation of serum levels of MMP-9, TIMP-1 and mutation of genes of angiotensinogen 1 Thr 174 Met, angiotensinogen 2 Met 235 Thr and apolipoprotein C3 C3238 G. In patients with metabolic syndrome in combination with paroxysmal form of atrial fibrillation the significant increase synthesis of MMP-9 level can lead to increase of atrial fibrillation paroxysms because of increase synthesis of collagen tissue in myocard and vessel walls. Also the significant high incidence of angiotensinogen 2 Met 235 Thr mutation was established.

Key words: MMP-9, TIMP-1, atrial fibrillation, metabolic syndrome, gene polymorphism

Формирование пароксизмов фибрилляции предсердий (ФП) может быть обусловлено структурным сердечно-сосудистым заболеванием, усилением метаболического дисбаланса, а также и неизученными по-

ка причинами [2]. В литературе последних лет все большее значение среди механизмов формирования структурных изменений миокарда и кардиальных сосудов уделяется иммунологическим нарушениям, и, в частности, связанным с функционированием матриксных металлопротеиназ (ММП) [6]. Регуляция активности ММП осуществляется на уровне транскрипции, а также путем их взаимодействия с ткане-

Для корреспонденции: Ахмедов Вадим Адильевич, д-р мед. наук, проф. каф. факультетской терапии ГБОУ ВПО ОмГМА Минздрава России. E-mail v_akhmedov@mail.ru

выми ингибиторами матриксных металлопротеиназ [8]. В то же время, все большее внимание в научной и практической литературе уделяется роли полиморфизмов генов в механизмах формирования сердечно-сосудистой патологии [5]. В связи с этим научный и практический интерес представляет оценка участия матриксной металлопротеиназы-9 (ММП-9), ее ингибитора — тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы-1 (ТИМП-1), а также полиморфизма генов ангиотензиногена 1, ангиотензиногена 2 и аполипопротеина в механизмах формирования пароксизмов ФП у больных с метаболическим синдромом.

Цель исследования — изучение патогенетического значения активности ММП-9, ТИМП-1, а также полиморфизма генов ангиотензиногена 1 Thr 174 Met, ангиотензиногена 2 Met 235 Thr и аполипопротеина С3 С3238 G у мужчин с метаболическим синдромом в сочетании с пароксизмальной формой фибрилляции предсердий в отношении формирования пароксизмов.

Методика

Критериями включения в исследование являлись признаки метаболического синдрома по National Cholesterol Education Program Adult treatment panel III, 2001 г.): объем талии >102 см, гликемия натощак $\geq 6,1$ ммоль/л, но <7 ммоль/л; и/или гликемия через 2 ч после нагрузки 75 г глюкозы в интервале от 7,8 до 11,0 ммоль/л включительно; ТГ $\geq 1,7$ ммоль/л; ХС ЛВП <1,0 ммоль/л, АД $\geq 130/85$ мм рт. ст [4]. Также критерием включения являлось наличие у больных пароксизмальной формы фибрилляции предсердий.

Критериями исключения были: сахарный диабет (СД) 1 типа, СД 2, ИБС, стенокардия напряжения ФК I—IV (согласно классификации канадской ассоциации кардиологов, 2001) нестабильная стенокардия, острый инфаркт миокарда, хроническая сердечная недостаточность, в том числе обусловленная перенесенным Q-инфарктом миокарда, НК I—III, бронхиальная астма и дыхательная недостаточность, нарушение мозгового кровообращения, хроническая почечная недостаточность, тяжелые нарушения функции печени (повышение уровня трансаминаз в крови в 2 раза более нормы), заболевания желудочно-кишечного тракта в стадии обострения, хронический алкоголизм; онкологические заболевания; прием антиагрегантов и антикоагулянтов; гиполипидемическая терапия; вторичные АГ; отказ от участия в исследовании.

В исследование было включено 60 мужчин, средний возраст которых составил $48,4 \pm 7,78$ года (основная группа). В группу контроля были включены 15 пациентов с артериальной гипертензией в сочетании с пароксизмальной формой ФП и нормальным индексом

массы тела. Участники данной группы обследовались для сравнения показателей полиморфизма генов.

Для всех пациентов осуществляли комплексную оценку клинического состояния, общие анализы крови и мочи, биохимический анализ крови, исследовали липидный спектр, ЭКГ покоя в 12 стандартных отведениях (12-канальный Hellige EK 56" (Германия)), измеряли «офисное» АД. Структурно-функциональные параметры сердца оценивались на ультразвуковом аппарате доплер-ЭХОКГ «LOGIQ 500» («General Electric», США) в М- и В-режимах в стандартных эхокардиографических позициях. Для исключения ранних клинических и инструментальных проявлений ИБС всем пациентам проводили нагрузочные пробы (верозергометрия) и мультиспиральная компьютерная томография с выявлением индекса кальциноза коронарных сосудов по шкале Агатсон. Для оценки состояния уровня артериального давления осуществляли суточное мониторирование АД на аппаратно-программном комплексе «Союз» фирмы «ДМС Передовые технологии» (Россия) не менее 22 ч с интервалами между измерениями 15 мин в дневное время (7—23 ч) и 30 мин в ночной период (23—7 ч).

Дополнительные лабораторные исследования включали определение концентрации матриксной металлопротеиназы-9 и тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы-1 в сыворотке крови, которые проводились стандартизированным методом твердофазного иммуноферментного анализа на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории Омской медицинской академии (заведующая — д.м.н., профессор Т.И. Долгих). Исследование проводили на наборах производства «Bender MedSystems GmbH» (Австрия).

Для выявления полиморфизма генов у пациентов исследовали мутации ангиотензиногена 1 Thr 174 Met, ангиотензиногена 2 Met 235 Thr и аполипопротеина С3 С3238 G. Исследование проводили методом полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией (система ООО НПФ «ЛИТЕХ», Россия). Анализировалась геномная ДНК человека, выделенная из лейкоцитов крови с помощью реагента «ДНК-ЭКСПРЕСС-кровь» Россия.

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью пакета программ Statistica (6.0). Использовались методы описательной статистики, дисперсионный анализ. Нормальность распределения признаков проверяли по критерию Колмогорова—Смирнова. Корреляционный анализ производился непараметрическим методом по Спирману; оценка достоверных межгрупповых различий осуществлялась с помощью теста Манна—Уитни и Краскела—Уоллиса. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования проводился анализ данных суточного мониторирования артериального давления. При этом среди обследованных больных с метаболическим синдромом у большинства отмечался сохраненный двухфазный ритм АД («dipper») — 36 больных (60%). У 12 больных (20%) отмечалось недостаточное снижение АД в ночные часы («non-dipper»), у 2 больных (3,3%) выявлялось чрезмерное снижение АД в ночной период («over-dipper»). У оставшихся 13 больных (16,7%) отмечалось устойчивое повышение АД в ночные часы («night-peaker»).

Для оценки взаимосвязи активности ММП-9 и ее ингибитора ТИМП-1 с показателями суточного мониторирования АД у обследованных больных проводился корреляционный анализ (табл. 1). Из результатов, представленных в табл. 1, обращает на себя внимание, что у обследованных пациентов с метаболическим синдромом в сочетании с пароксизмальной формой фибрилляции предсердий выявлялись достоверные корреляционные связи между сывороточной концентрацией ММП-9 и пульсовым артериальным давлением ($r = 0,47$, $p = 0,02$), а также между сыво-

роточной концентрацией ММП-9 и вариабельностью систолического ($r = 0,48$, $p = 0,04$) и пульсового давления ($r = 0,42$, $p = 0,02$).

Следующим этапом исследования явилось оценка взаимосвязи между показателями эхокардиографического исследования и сывороточными концентрациями ММП-9 и ТИМП-1. При проведении сравнительного анализа пациенты основной группы были разделены на две подгруппы в зависимости от индекса массы миокарда левого желудочка. Первую группу сравнения составили 37 пациентов с увеличенным индексом массы миокарда левого желудочка >134 г/м². Вторую группу соответственно составили 23 пациента с нормальным индексом массы миокарда левого желудочка ≤ 134 г/м². Результаты исследования представлены в табл. 2.

Как видно из данных табл. 2, у обеих групп пациентов показатели как ММП-9, так и ТИМП-1 были выше нормальных значений. При сравнительном анализе различий сывороточной активности ММП-9 между двумя группами больных было выявлено статистически значимое увеличение уровня ММП-9 ($p = 0,001$) в группе больных с увеличенным ИММЛЖ в сравнении с больными с нормальным ИММЛЖ. При анализе активности ТИМП-1 было

Таблица 1

Результаты корреляционного анализа активности ММП-9, ТИМП-1 с показателями суточного мониторирования АД

Показатели СМАД	ММП-9 (нг/мл)	ТИМП-1 (нг/мл)
Индекс времени диастолического артериального давления (ночь), %	$r = -0,19$; $p > 0,05$	$r = -0,09$; $p > 0,05$
Нормированный индекс плотности диастолического артериального давления (ночь), %	$r = -0,19$; $p > 0,05$	$r = -0,11$; $p > 0,05$
Пульсовое артериальное давление (24 ч), мм рт.ст.	$r = 0,47$; $p = 0,02$	$r = 0,13$; $p > 0,05$
Пульсовое артериальное давление (день), мм рт.ст.	$r = 0,30$; $p = 0,04$	$r = 0,13$; $p > 0,05$
Пульсовое артериальное давление (ночь), мм рт.ст.	$r = 0,49$; $p = 0,01$	$r = 0,09$; $p > 0,05$
Вариабельность систолического артериального давления (24 ч), мм рт.ст.	$r = 0,48$; $p = 0,04$	$r = 0,21$; $p > 0,05$
Вариабельность пульсового артериального давления (24 ч), мм рт.ст.	$r = 0,42$; $p = 0,02$	$r = 0,31$; $p > 0,05$
Вариабельность двойного произведения (24 ч), мм рт.ст. \times уд./мин	$r = 0,41$; $p = 0,03$	$r = 0,27$; $p > 0,05$
Степень ночного снижения частоты сердечных сокращений, %	$r = 0,08$; $p > 0,05$	$r = 0,11$; $p > 0,05$
Диастолическое артериальное давление (24 ч), мм рт.ст.	$r = 0,11$; $p > 0,05$	$r = -0,09$; $p > 0,05$

Таблица 2

Показатели пациентов в зависимости от величины индекса массы миокарда левого желудочка

Показатели	ИММЛЖ — норма ≤ 134 г/м ² (n = 23)	ИММЛЖ увеличен > 134 г/м ² (n = 37)	p
Возраст, лет	$49,4 \pm 3,79$	$53,2 \pm 4,1$	0,32
Длительность АГ, лет	$8,4 \pm 2,9$	$10,1 \pm 3,2$	0,45
Офисное САД, мм рт.ст.	$153 \pm 2,53$	$159 \pm 1,77$	0,56
Офисное ДАД, мм рт.ст.	$91 \pm 1,87$	$93 \pm 2,61$	0,11
Длительность ФП, лет	$3,4 \pm 0,98$	$5,6 \pm 0,71$	0,02
Количество пароксизмов в анамнезе	$9,4 \pm 1,24$	$11,9 \pm 2,23$	0,56
ММП-9, нг/мл (норма до 40 нг/мл)	$62,37 \pm 1,08$	$89,3 \pm 0,86$	0,001
ТИМП-1, нг/мл (норма до 80 нг/мл)	$94,2 \pm 1,2$	$157,6 \pm 0,96$	0,003

отмечено, что она были также статистически значимо повышена ($p = 0,003$) в группе больных с увеличенным ИММЛЖ в сравнении с больными с нормальным ИММЛЖ, что может быть связано с усилением ответной реакцией организма на повышенную активность матриксной металлопротеиназы-9.

Следующим этапом нашего исследования явилось изучение полиморфизма генов ангиотензиногена 1 Thr 174 Met, ангиотензиногена 2 Met 235 Thr и аполипопротеина C3 C3238 G, для чего проводилась оценка частоты их мутаций у 25 пациентов основной группы и у 15 пациентов группы сравнения — пациентов с артериальной гипертензией в сочетании с пароксизмальной формой ФП и нормальным индексом массы тела. Результаты исследования представлены в табл. 3. Как видно из представленной таблицы, у пациентов основной группы наблюдалось статистически значимое ($p = 0,002$) увеличение частоты мутаций гена ангиотензиногена 2 Met 235 Thr. Что касается мутаций других генов, то статистически значимых различий между группами выявлено не было.

В проведенных ранее исследованиях было доказано, что ММП-9 по степени провоспалительной активности, сравнима с действием провоспалительных цитокинов (ФНО α , ИЛ-1 β) [12]. Кроме того, было доказано, что присущая ММП-9 повышенная протеолитическая активность способствует прогрессированию воспалительного процесса [9]. В проведенных нами ранее исследованиях была выявлена достоверная корреляционная связь между активностью ММП-9 в сыворотке крови и индексом массы тела, а также между окружностью талии и концентрацией ММП-9 [1]. Известно, что абдоминальный тип ожирения у мужчин с метаболическим синдромом способствует активному запуску выработки жировой тканью провоспалительного цитокина фактора некроза опухоли α [14], который является одним из индукторов синтеза ММП-9 клетками сосудистого эндотелия, приводя к разрушению базальной мембраны сосудистого эндотелиального барьера и усиливая сосудистую проницаемость. Данная последовательная цепь активации нарушений иммунологических параметров приводит к усилению воспалительной реакции и последующему разрастанию синтеза коллагена в зо-

не воспаления [5]. Выявленная в проведенном исследовании положительная корреляционная связь между активностью ММП-9 и значением пульсового АД, отражающей степень накопления коллагеновой ткани в сосудах [5], указывает на утолщение сосудистой стенки у пациентов. Кроме того, статистически значимое увеличение активности ММП-9 в группе больных с увеличенным ИММЛЖ указывает на то, что у пациентов с метаболическим синдромом в сочетании с пароксизмальной формой ФП происходит увеличение массы миокарда левого желудочка как вследствие ее гипертрофии, так и вследствие увеличения содержания коллагена в самом миокарде. Данный факт, безусловно, является одним из наиболее неблагоприятных факторов, способствующих увеличению частоты и продолжительности пароксизмов фибрилляции предсердий за счет вовлечения в процесс пучков проводящей системы сердца. Что касается ТИМП-1, то повышение его сывороточной активности отражает защитную реакцию организма на воспаление и синтез коллагена, учитывая то, что он является ингибитором ММП-9 [8, 11].

Учитывая полученные результаты, выявившие статистически значимую высокую частоту мутаций гена ангиотензиногена 2 Met 235 Thr у пациентов с метаболическим синдромом в сочетании с пароксизмальной формой ФП, при низкой частоте мутаций гена ангиотензиногена 1 Thr 174 Met становится очевидным целесообразность включения в патогенетически обоснованную терапию пациентам ингибиторов ангиотензин превращающего фермента в качестве средств выбора для регресса гипертрофии миокарда, в то время как применение блокаторов рецепторов ангиотензина II должно проводиться лишь при выявлении отсутствия мутации вышеуказанного гена.

Повышенная сывороточная активность ММП-9 у больных с метаболическим синдромом в сочетании с пароксизмальной формой ФП является патогенетически значимым фактором в отношении увеличения содержания коллагена в сосудистой стенке. Активация ММП-9 у больных имеет значимую патогенетическую роль в отношении роста в гипертрофированном миокарде содержания коллагеновой ткани, что, в свою очередь, может служить пусковым фактором увеличе-

Таблица 3

Частота мутаций генов у пациентов с метаболическим синдромом и ФП в сравнении с группой больных с артериальной гипертензией в сочетании с ФП и нормальным индексом массы тела

Вид полиморфизма генов	Основная группа (n = 25)	Группа сравнения (n = 15)	p
	Частота встречаемости мутации		
Ген ангиотензиногена 1 Thr 174 Met	1 (4%)	1 (6,6%)	0,99
Ген ангиотензиногена 2 Met 235 Thr	21 (84%)	5 (33,3%)	0,002
Ген аполипопротеина C3 C3238 G	8 (32%)	3 (20%)	0,48

ния частоты и продолжительности пароксизмов фибрилляции. Статистически значимая высокая частота мутаций в гене ангиотензиногена 2 Met 235 Thr позволяет рекомендовать в качестве патогенетически обоснованной терапии пациентам ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента как средства выбора для уменьшения гипертрофии миокарда и тем самым частоты и длительности пароксизмов фибрилляции предсердий.

Список литературы

1. **Ахмедов В.А., Долгих В.Т., Наумов Д.В., Дворников В.Э.** Металлопротеиназная активность у больных с метаболическим синдромом и фибрилляцией предсердий // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. — 2010. — Т. 8. — Вып. 4. — С. 113—118.
2. **Ахмедов В.А., Долгих В.Т., Наумов Д.В., Дворников В.Э.** Современные взгляды на тактику ведения пациентов с фибрилляцией предсердий // Врач. — 2008. — №2. — С. 65—66.
3. **Ахмедов В.А., Тращенко А.С.** Иммунологические механизмы формирования ишемической болезни сердца // Вестник Новосибирского государственного университета, серия биология, клиническая медицина. — 2009. — №7. — С. 124—128.
4. **Звенигородская Л.А.** Метаболический синдром: основы патогенеза, исследования в будущем // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. — 2007. — №1. — С. 5—7.
5. **Хежева Ф.М., Мазур Н.А.** Сывороточные маркеры фиброза у больных артериальной гипертонией // Кардиология. — 2006. — №3. — С. 64—67.
6. **Keeling J., Herrera G.A.** Human matrix metalloproteinases: Characteristics and pathologic role in altering mesangial homeostasis // *Microsc. Res. Tech.* — 2008. — №71. — P. 371—379.
7. **Lauer-Fields J.L., Whitehead J.K., Li S.** et al. Selective modulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) functions via exosite inhibition // *J. Biol. Chem.* 2008. — №283. — P. 20087—20095.
8. **Lindsey M.L., Zamilpa R.** Temporal and Spatial Expression of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Following Myocardial Infarction // *Cardiovascular. Therapeutics.* — 2012. — №30. — P. 31—41.
9. **Nie R., Xie S., Du B.** et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) is increased in human left ventricle after acute myocardial infarction // *Arch. Med. Res.* — 2009. — №40. — P. 605—611.
10. **Porter K.E., Turner N.A.** Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling // *Pharmacol. Ther.* — 2009. — №123. — P. 255—278.
11. **Spinale F.G.** Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: Influence on cardiac form and function // *Physiol. Rev.* — 2007. — №87. — P. 1285—1342.
12. **Van Den Borne S.W., Cleutjens J.P., Hanemaaijer R.** et al. Increased matrix metalloproteinase-8 and -9 activity in patients with infarct rupture after myocardial infarction // *Cardiovasc. Pathol.* — 2009. — №18. — P. 37—43.
13. **Zamilpa R., Lindsey M.L.** Extracellular matrix turnover and signaling during cardiac remodeling following MI: Causes and consequences // *J. Mol. Cell. Cardiol.* — 2010. — №48. — P. 558—563.
14. **Zamilpa R., Lopez E.F., Chiao Y.A.** et al. Proteomic analysis identifies in vivo candidate matrix metalloproteinase-9 substrates in the left ventricle post-myocardial infarction // *Proteomics.* — 2010. — №10. — P. 2214—2223.

Поступила 24.07.13

Сведения об авторах:

Долгих Владимир Герентьевич, д-р мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии с курсом клинической патофизиологии ГБОУ ВПО ОмГМА Минздрава России

Наумов Дмитрий Валерьевич, канд. мед. наук, врач-кардиолог кардиологического отд. НУЗ ОКБ на станции Омск-Пассажирский ОАО РЖД

Нечипоренко Наталья Александровна, зав. отд. функциональной диагностики НУЗ ОКБ на станции Омск-Пассажирский ОАО РЖД

Р.В. Карпова¹, Е.В. Бочаров², И.В. Казеев¹, В.Г. Кучеряну², О.А. Бочарова¹

Радиозащитная эффективность мультифитоадаптогена в опытах на собаках

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина» Российской академии медицинских наук, Москва, 115478, Каширское ш., 24

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

В работе изучена радиозащитная эффективность мультифитоадаптогена (МФА) на собаках при различных режимах γ -облучения и применения препарата. Исследование проводили на 42 беспородных собаках. Собаки опытных групп получали МФА с питьевой водой в виде 15%-ного раствора в течение 2 недель до облучения (профилактический вариант), в течение 2 недель до и 2 недель после облучения (лечебно-профилактический вариант), а также в течение 2 недель после облучения (лечебный вариант). Собаки контрольной группы получали в качестве питья воду на фоне облучения. Животных подвергали общему острому γ -облучению в дозе 3,5 Гр с мощностью дозы 1,98 Гр/мин и общему пролонгированному γ -облучению в дозе 8,0 Гр с мощностью дозы 1,0 сГр/мин. Эффективность препарата оценивали по выживаемости и продолжительности жизни животных после облучения. В условиях острого и пролонгированного γ -облучения МФА повысил выживаемость собак во всех вариантах применения (профилактическом, лечебно-профилактическом и лечебном). Результаты позволяют полагать, что МФА обладает потенциальным радиозащитным эффектом, вероятно, обусловленным его иммуномодулирующими и антиоксидантными свойствами.

Ключевые слова: ионизирующая радиация, мультифитоадаптоген, радиозащитная эффективность

R.V. Karpova¹, E.V. Bocharov², I.V. Kazeev¹, V.G. Kucheryanu², O.A. Bocharova¹

Investigation of multiplytoadaptogene anti-radiation efficacy in dogs experiments

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

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

The purpose of the work was to elucidate the radioprotective efficacy of multiplytoadaptogene (MPA) in dogs in various conditions of gamma radiation and MPA application. Dogs were given 15% MPA solution with drinking water in 3,6 ml/kg dose per day 2 weeks before the radiating (preventive application), 2 weeks before and 2 weeks after the radiating (preventive and therapeutic application) as well as 2 weeks after the radiating only (therapeutic application). Animals of control groups received radiation. Dogs were exposed to 3,5 Gy acute radiation and 8,0 Gy prolonged radiation. There were no survived dogs in control groups. At the same time MPA increased dogs survival in preventive, preventive and therapeutic as well as therapeutic applications after 3,5 Gy acute radiation and after 8,0 Gy prolonged radiation. MPA improved the somatic state, interfere with leukocytes amount in blood. The data obtained suggest the radioprotective efficacy of MPA.

Key words: ionizing radiation, multiplytoadaptogen, anti-radiation efficacy

В последние годы проблема противорадиационной защиты и изыскание новых радиопротекторов из различных классов химических и природных соединений приобретает все большую актуальность в связи с расширением сфер использования источников ионизирующих излучений.

Перспективными в этом направлении являются растительные адаптогены, которые не обладают специфическим противолучевым действием, но способны повышать общую сопротивляемость организма к раз-

личным неблагоприятным факторам, в частности, к радиации [8, 10]. У фитоадаптогенов выявлены антиоксидантные, антимуtagenные и иммуномодулирующие свойства, что является важным фактором для проявления их радиозащитного эффекта [9, 11, 12].

Мультифитоадаптоген (МФА) состоит из компонентов экстрактов сорока растений, включенных в Госфармакопею РФ, в том числе женьшеня, родиолы, элеутерококка, лимонника, калгана, можжевельника, сосновых и березовых почек, солодки, шиповника и др. Разработаны способы его биологической и химической стандартизации [1, 7]. МФА обладает антиоксидантным, иммуномодулирующим, антимуtagenным действием [2—6].

Для корреспонденции: Карпова Регина Васильевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. иммунофармакологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН. E-mail: planta39@rambler.ru

Цель работы — изучение радиозащитной эффективности МФА на крупных лабораторных животных (собаках) при различных режимах γ -облучения и применения препарата.

Методика

Исследование проводили на 42 беспородных собаках обоего пола с исходной массой $15,5 \pm 0,5$ кг. Условия γ -облучения:

1) острое облучение собак в дозе 3,5 Гр на цезиевой установке ИГУР (^{137}Cs) с мощностью дозы 1,98 Гр/мин;

2) пролонгированное облучение собак в дозе 8,0 Гр на установке ГУБ-1 (^{137}Cs) с мощностью дозы 1 сГр/мин.

Животные были разделены на 4 группы.

Опытные группы:

1 — собаки, подвергшиеся γ -облучению и получавшие МФА в профилактическом режиме в течение 2 недель до облучения;

2 — собаки, подвергшиеся γ -облучению и получавшие МФА в лечебно-профилактическом режиме в течение 2 недель до и 2 недель после облучения;

3 — собаки, подвергшиеся γ -облучению и получавшие МФА в лечебном режиме в течение 2 недель после облучения.

4-я группа, контрольная, — животные, подвергшиеся острому или пролонгированному γ -облучению и получавшие в качестве питья только воду.

Животные опытных групп получали МФА в виде 15% раствора в дозе 3,6 мл/кг в сут., рассчитанной на основании предыдущих исследований [1, 3].

Основными критериями радиозащитного действия МФА являлись выживаемость облученных собак, а также средняя продолжительность жизни погибших собак (СПЖ). Дополнительно оценивали общее состояние животных, динамику веса, уровень лейкоцитов в периферической крови.

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 χ^2 .

Результаты и обсуждение

При остром облучении наибольшая эффективность МФА (33,3% выживаемости) выявлена в 1-й группе. Во 2-й и 3-й группах выживаемость собак составила 25 и 20% соответственно. В контрольной группе наблюдали полную гибель животных. СПЖ погибших собак опытных групп статистически значимо увеличилась в 1,3 раза. Применение МФА при остром облучении препятствовало снижению числа лейкоцитов в периферической крови собак (табл. 1).

Анализ кривых выживаемости собак (рис. 1) с использованием критерия F-Кокса выявил статистически значимые различия между опытными и контрольной группами ($p_{1-К} < 0,01$; $p_{2-К} < 0,04$; $p_{3-К} = 0,04$).

При пролонгированном облучении выживаемость собак в 1-й группе составила 40%. Ниже оказалась выживаемость животных во 2-й и 3-й группах (20%). В контрольной группе ни одно животное не выжило. СПЖ погибших собак 1-й и 2-й групп увеличилась в среднем в 1,3 раза. Применение МФА при пролонгированном облучении препятствовало снижению числа лейкоцитов в периферической крови собак (табл. 2).

Использование критерия F-Кокса позволило выявить статистически значимые расхождения кривых выживаемости между данными групп профилактического и лечебно-профилактического применения МФА и контрольной группы ($p_{1-К} < 0,02$; $p_{2-К} < 0,04$) (рис. 2).

Вместе с тем, суммируя данные опытов при остром и пролонгированном облучении, МФА при всех вариантах применения обуславливал статистически значимое повышение выживаемости собак до 26,7% ($p < 0,05$) при 100%-ной гибели животных в контрольной на облучение группе.

У контрольных собак наблюдали проявления лучевой болезни III степени тяжести с поражением кроветворения к 10-м суткам, вялостью, потерей аппетита и веса, отеком конечностей и морды, ангиной. У животных опытных групп течение лучевого поражения проходило в более легкой форме (II степень тяжести). Следует отметить, что при пролонгированном облучении в группах животных с профилактическим и лечебно-профилактическим введением МФА средний уровень лейкоцитов в периферической крови к 10-м суткам наблюдения после облучения не снижался менее 1,0 тыс./мм³.

Таким образом, полученные результаты исследования свидетельствуют, что при остром и пролонгированном γ -облучении мультифитоадаптоген повысил радиорезистентность собак во всех вариантах применения (профилактическом, лечебно-профилактическом и лечебном).

Следует отметить, что до настоящего времени все опубликованные результаты противолучевой активности растительных адаптогенов получены в опытах на мышах. Поэтому изучение противолучевой активности МФА в терапевтических дозах у собак представляет собой научный и практический интерес. При двух различных режимах лучевого воздействия, остром и пролонгированном, получен определенный положительный результат. Это расширяет перспективу практического применения МФА и дает основание сделать вывод о возможности применения ее в качестве активного адаптогена, обладающего противолучевым эффектом.

Таблица 1

Радиозащитное действие мультифитоадаптогена в опытах на собаках в условиях острого γ -облучения в дозе 3,5 Гр

№ группы (условия эксперимента)	Количество собак в группе	Количество выживших собак	Выживаемость собак* (%)	Количество лейкоцитов в крови		Степень тяжести лучевой болезни	СПЖ погибших собак (сут.)
				Сут.	Тыс./мм ³		
1. (МФА + О)	6	2	33,3	10	1,1	II	16,0 ± 0,7
2. (МФА + О + МФА)	4	1	25,0	10	0,9	II	15,7 ± 0,9
3. (О + МФА)	5	1	20,0	10	0,8	II	14,8 ± 0,5
4. (Контроль)	6	0	0	10	0,5	III	11,8 ± 0,8
p			p _{1-к} > 0,05** p _{2-к} > 0,05** p _{3-к} > 0,05**				p _{1-к} = 0,007*** p _{2-к} = 0,02*** p _{3-к} = 0,03***

Примечание. МФА — применение препарата; О — облучение; * — наблюдение в течение 30 дней; ** — по критерию χ^2 ; *** — по критерию Стьюдента.

Таблица 2

Радиозащитное действие мультифитоадаптогена в опытах на собаках в условиях пролонгированного γ -облучения в дозе 8,0 Гр

№ группы (условия эксперимента)	Количество собак в группе	Количество выживших собак	Выживаемость собак* (%)	Количество лейкоцитов в крови		Степень тяжести ОЛБ	СПЖ погибших собак (сут.)
				Сут.	Тыс./мм ³		
1. (МФА + О)	5	2	40,0	10	1,5	II	14,3 ± 0,9
2. (МФА + О + МФА)	5	1	20,0	10	1,3	II	13,2 ± 0,6
3. (О + МФА)	5	1	20,0	10	0,8	III	12,3 ± 0,9
4. (Контроль)	6	0	0	10	0,4	III	10,8 ± 0,8
p			p _{1-к} > 0,05** p _{2-к} > 0,05** p _{3-к} > 0,05**				p _{1-к} = 0,03*** p _{2-к} = 0,03*** p _{3-к} = 0,3***

Примечание. МФА — применение препарата; О — облучение; * — наблюдение в течение 30 дней; ** — по критерию χ^2 ; *** — по критерию Стьюдента.

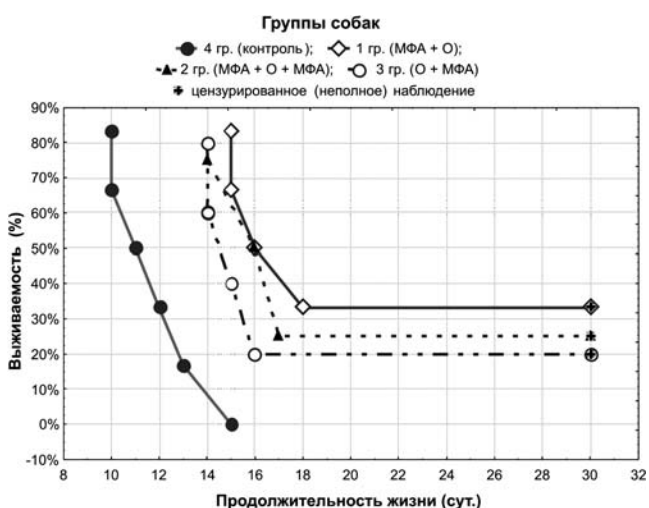


Рис. 1. Кривые выживаемости собак при разных вариантах применения МФА в условиях острого γ -облучения в дозе 3,5 Гр (по методу Каплан–Мейера): МФА — применение препарата; О — облучение; p_{1-к} < 0,01; p_{2-к} < 0,04; p_{3-к} = 0,04 (по критерию F-Кокса).

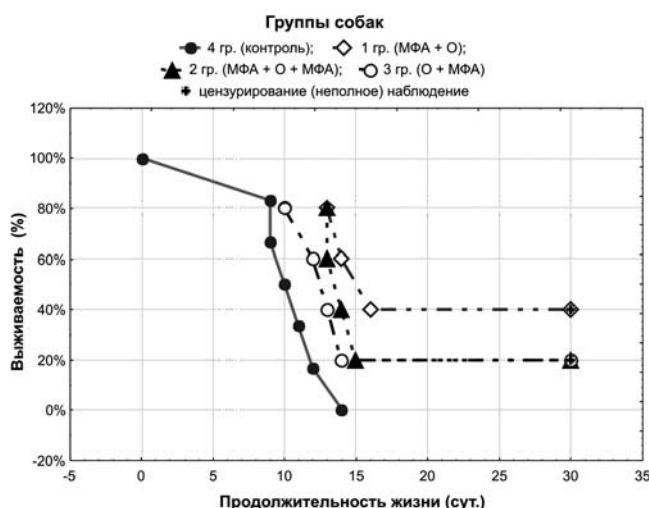


Рис. 2. Кривые выживаемости собак при разных вариантах применения МФА в условиях пролонгированного γ -облучения в дозе 8,0 Гр (по методу Каплан–Мейера): МФА — применение препарата; О — облучение; p_{1-к} < 0,02; p_{2-к} < 0,04; p_{3-к} = 0,2 (по критерию F-Кокса).

Авторы выражают благодарность 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. **Бочарова О.А., Лыженкова М.А., Куренная О.Н.** и др. Способ биологического контроля комплексного фитоадаптогена // Бюлл. exper. биол. и мед. — 2003. — Т. 136, №12. — С. 694—696.
2. **Бочарова О.А., Пожарицкая М.М., Чекалина Т.Л.** и др. Роль адгезионных нарушений в патогенезе лейкоплакии и возможности их коррекции неспецифическим иммуномодулятором // Иммунология. — 2004. — Т. 25, №1. — С. 36—43.
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. exper. 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. exper. 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. **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.

8. **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.

9. **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.

10. **Chen N., Zhao S.** Radioprotection related activities of medicinal plant // Zhongguo Zhong Yao Za Zhi — 2007. — Vol. 32, №13. — P. 1263—1266.

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. **Jin Y., Kotakadi V., Ying L.** et al. American ginseng suppresses inflammation and DNA damage associated with mouse colitis // Carcinogenesis. — 2008. — Vol. 29, №12. — P. 2351—2359.

Поступила 31.10.13

Сведения об авторах:

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

Г.В. Порядин¹, С.А. Обрубов¹, О.А. Богинская², М.И. Пыков³, Г.В. Ставицкая⁴

Морфологические особенности сосудов иридоцилиарной системы после применения биопунктуры антигомотоксическим препаратом

¹ 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

² Федеральное государственное бюджетное учреждение Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1

³ Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия последипломного образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123836, Москва ул. Баррикадная, 2/1

⁴ Центр охраны зрения «Доктор Оптикус», 119618, Москва, ул. Главмосстроая, 10

Цель: изучить ультраструктурные особенности сосудов иридоцилиарной системы после применения биопунктуры антигомотоксическим препаратом. *Методика:* Экспериментальная работа проводилась на 15 кроликах-самцах «шиншилла» с исходной массой 2,0—2,5 кг возрасте 2 мес. Контрольную группу составили 5 кроликов. Опытная группа состояла из 10 кроликов, которым с целью моделирования близорукости под общим наркозом в левую внутреннюю сонную артерию устанавливался катетер Vasofix Certo 24G. В последующем осуществлялось ежедневное введение 0,5 мл транс-ретиноевой кислоты в течение 6 мес. При проведении дальнейшего экспериментального исследования 10 животных опытной группы были разделены на 2 подгруппы. В первой подгруппе ежедневно проводили внутрикожные инъекции в 3 точках орбитальной области верхних век правого глаза без введения лекарственных средств; во второй подгруппе внутрикожные инъекции в орбитальной области верхних век левого глаза сочетались с введением препарата церебрум-комполитум Н. Проводилась морфологическая оценка структур иридоцилиарной системы. *Результаты и обсуждение:* биопунктура в условиях экспериментальной близорукости повышает уровень метаболических реакций иридоцилиарной системы, в условиях растяжения склеры восполняет адаптационные резервы, как за счет улучшения гемодинамических параметров сосудов ресничной мышцы, так и вероятно за счет восстановления баланса вегетативной иннервации.

Ключевые слова: биопунктура, экспериментальная модель близорукости, гистологический и морфометрический анализ, вегетативная нервная система

G.V. Poradin¹, S.A. Obrubov¹, O.A. Boginskaya², M.I. Pykov³, G.V. Stavitskaya⁴

Ultrastructural features of vascular iridociliary system after biopuncture by antihomotoxic medicine

¹ Russian National Research Medical University, 1, Ostrovitanova str., Moscow, 117997, Russia

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

³ Russian medical academy of postdegree education, 2/1, Barrikadnaya str., Moscow, 123836, Russia

⁴ Center of vision care «Dr.Opticus», 10, Glavmosstroya str., Moscow, 119618, Russia

Objective: to reveal ultrastructural features of iridociliary vessels after biopuncture with antihomotoxic medicine. *Methods:* Myopia model was created on 10 rabbits by injecting all trans-retinoic acid in catheter Vasofix Certo 24G in left internal carotid artery until we got low myopia. After six months of daily injections all rabbits had myopia from -2,0 to 3,0 D. Animals were separated into two groups: 5 rabbits with daily intradermal injection in three points of upper eye lid without medicine during 10 days and 5 rabbits with daily intradermal injection in three points of upper eye lid with Cerebrum Compositum N during 10 days. Morphology of iridociliary system was explored. *Results:* biopuncture in myopia model increases level of metabolic reactions in iridociliary system, supplies adaptive reserves by the hemodynamic enrichment of ciliary body vessels and balance of autonomic nervous system impulsion.

Key words: biopuncture, myopia model, histologic and morphometric analysis, autonomic nervous system

Одним из возможных путей повышения эффективности лечения прогрессирующей близорукости является использование достижений эмпирической офтальмологии. Необходимость применения оригинальных экспериментальных моделей в настоящее время очевидна. Моделирование близорукости нацелено на воспроизведение клинично-анатомического комплекса симптомов, характеризующих данную болезнь, и преследует несколько задач: возможность раскрытия её этиологии и патогенеза, а также уточнение некоторых сторон лечебного воздействия [9, 14].

Между тем, экспериментальное подтверждение разрабатываемых как хирургических, так и нехирургических методов лечения прогрессирующей близорукости за немногими исключениями проводится на здоровых экспериментальных животных, без моделирования патологического состояния, что весьма затрудняет выявление истинного лечебного эффекта и их объективную сравнительную оценку. Поэтому разработка патогенетически ориентированных нехирургических методов лечения, которые бы сочетали в себе преимущества ранее

известных вмешательств с получением еще большего эффекта в улучшении состояния оболочек и функций миопического глаза, нуждается в сопровождении экспериментальных исследований.

В настоящее время описан ряд подходов к нехирургическому лечению близорукости [7, 8, 10—13]. Одним из направлений интегративного подхода в лечении прогрессирующей близорукости является применение биопунктуры (фармакопунктуры), объединяющей медикаментозное воздействие и иглорефлексотерапию [1, 5]. В ней выделяется по крайней мере несколько ведущих механизмов. С одной стороны, рефлекторная составляющая позволяет рассматривать фармакопунктуру как способ локальной пролонгированной стимуляции точек рефлексотерапии, вследствие чего создается искусственная доминанта, переключающая патологическую импульсацию на себя, способствующая разрушению компонентов патологической реакции и созданию условий для нормализации функционирования нервной системы. С другой стороны, необходимо учитывать и терапевтическое действие лекарственных препаратов, введенных в точки акупунктуры. Сила и длительность действия препаратов при таком способе их введения возрастают в несколько раз.

В последние годы опубликован ряд исследований, подтверждающих терапевтический эффект биопунктуры [3, 4]. Необходимым этапом при оценке эффективности данного метода воздействия на ткани глазного яблока при экспериментальной миопии является получение сведений о реакции сосудов иридоцилиарной системы.

Цель исследования — изучение ультраструктурных особенностей сосудов иридоцилиарной системы после применения биопунктуры антигомотоксическим препаратом.

Методика

Экспериментальные исследования проведены на базе Научно-исследовательского института фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований при Российском национальном исследовательском медицинском университете им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Работа проведена на 15 кроликах-самцах «шиншилла» с исходной массой 2,0—2,5 кг, возраст 2 мес. Исследования проведены в соответствии с основными положениями международной резолюции ARVO (Ассоциации по офтальмологии и исследованию зрения). Контрольная группа состояла из 5 кроликов. В опытную группу вошли 10 кроликов, которым с целью моделирования близорукости в левую внутреннюю сонную артерию устанавливался катетер Vasofix Certo 24G (B.Braun, Belgium, Luxemburg) (рис. 1). Операция осуществлялась под общим наркозом: для премедикации вводили 2% раствор ксилосина гидрохлорида (рометар). Через 10—15 мин. внутривенно в краевую вену уха вводили золетил — 50 в



Рис. 1. Катетеризация левой внутренней сонной артерии кролика



Рис. 2. Рентгенограмма кролика, полученная при введении рентгенконтрастного вещества. Контрастируется левая внутренняя сонная артерия

дозе 6,6 мг/кг массы тела. Правильное положение катетера контролировалось проведением рентгенограммы черепа в боковой проекции после введения 0,5 мл рентгенконтрастного вещества Омнипак (Amersham Health, Cork, Ireland) в концентрации 300 мг/мл (рис. 2). В последующем в течение 6 мес. ежедневно вводили 0,5 мл транс-ретиноевой кислоты в концентрации 0,06 мг/мл (Sigma-Aldrich, USA).

Доминирующей клинической рефракцией в контрольных глазах экспериментальных животных на всем сроке наблюдения являлась гиперметропия от +2,5 до +3,5 дптр. Клиническая рефракция опытных глаз животных изменилась от гиперметропии +3,5±0,05 дптр в начале эксперимента до близорукости -2,5±0,26 дптр в конце срока наблюдения.

Животные опытной группы в дальнейшем были разделены на 2 подгруппы. Животным 1-й подгруппы (5 кроликов) ежедневно в течение 10 сут проводили внутрикожные инъекции в 3 точках орбитальной области верхних век левого глаза без введения лекарственных средств; во 2-й группе (5 кроликов) внутрикожные инъекции в орбитальной области верхних век левого глаза сочетались с введением препарата церебрум-композиум Н в количестве 0,1 мл в каждую точку через день в течение 10 сут.

Препарат церебрум-композиум Н (Биологише Хайльмиттель Хеель ГмбХ, Германия) содержит суис-органные компоненты Cerebrum, Embryosuis, Nepar, Placenta, а также составляющие растительного происхождения и минералы. Препарат оказывает иммуностимулирующее, сосудорасширяющее, антиспастическое, гемостатическое, метаболическое действие.

Кроликов выводили из эксперимента под общим наркозом, воздушной эмболией.

Для оценки морфологических изменений со стороны цилиарного тела, его отростков, радужки и склеры глазные яблоки после энуклеации погружали в охлажденный 2,5% раствор глутаральдегида на фосфатном буфере рН 7,2—7,4. Затем кусочки ткани, взятые из области воздействия, фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида на 0,2 М какодилатном буфере, промывали в дистиллированной воде, обезвоживали в растворах ацетона восходящей концентрации и высушивали методом перехода через критическую точку. Полутонкие срезы, полученные на ползковом микротоме Richert, толщиной 6—7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином по общепринятой методике [6]. Гистологические препараты исследовали на световом микроскопе «Фотомикроскоп 3» («Opton», Германия). Фоторегистрацию осуществляли на цифровую камеру в комплекте аппаратно-программного комплекса автоматической морфоденситометрии «Диаморфобъектив» (компания «ДиаМорф»).

Для исследования методом трансмиссионной электронной микроскопии материал фиксировали в 2,5%

растворе глутаральдегида в течение 4 ч с последующей постфиксацией четырехокисью осмия в течение 1 ч. После этого образцы промывали в дистиллированной воде (2 смены по 30 мин), обезвоживали в спиртах и окиси пропилену и заливали в эпон по общепринятой методике. Ультратонкие срезы готовили на специальном приборе ЛКВ, окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца по общепринятой схеме и изучали на трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100.

Препараты, окрашенные гематоксилином и эозином, использовали для выявления общих особенностей гистоархитектоники тканей глаза и проведения морфометрических исследований.

Результаты и обсуждение

В результате проведенного гистологического и морфометрического анализа препаратов тканей глаза у животных 1-й группы не выявлено существенных различий по сравнению с контролем, хотя отмечена тенденция к расширению сосудов малого калибра ресничного тела.

Напротив, после внутрикожного введения церебрум-композиум Н у 2-й группы животных морфологические изменения сосудов иридоцилиарной системы были очевидны и проявлялись в выраженном расширении всех сосудов. Состояние экстрацеллюлярного матрикса, особенно в области сосудов, характеризуется как разреженное.

Отмечена реакция на проводимое воздействие и со стороны железистого слоя эпителия цилиарного тела, который менялся от кубического до призматического, выявлено увеличение числа свободных рибосом в цитоплазме клеток, расширение цистерн гранулярной эндоплазматической сети, локальное расширение перинуклеарного пространства, увеличение количества пиноцитозных пузырьков. Полученные в результате световой и электронной микроскопии морфологические данные характеризуют повышение функциональной активности эпителиоцитов железистого эпителия ресничного тела.

Выявленные изменения указывают на усиление кровоснабжения иридоцилиарной системы при воздействии лекарственными средствами и, как следствие, интенсификации белкового синтеза эпителиальными клетками.

Особое значение при анализе ультраструктурных особенностей иридоцилиарной системы после применения локальной биопунктуры век имеет получение сведений о состоянии гематоофтальмического барьера, призванного в нормальных физиологических условиях защищать внутренние ткани глаза от вредных влияний веществ, циркулирующих в крови, и осуществлять обмен тканей глаза с кровью [2].

В результате проведенных морфологических и морфометрических исследований выявлены изменения, которые свидетельствуют о вероятном увеличении фенестрированной поверхности капилляров ресничного тела и его отростков, радужки глаз, что указывает на усиление процес-

сов трансэндотелиального обмена. Полученные данные о состоянии эпителиоцитов в виду отведенной им роли в гематоофтальмическом барьере, указывают на усиление тканевого метаболизма. Однако повышение активности эпителиоцитов и изменения со стороны эндотелиоцитов не сопровождалось признаками функционального перенапряжения, что указывает на вероятное отсутствие возможностей развития патологических изменений при повторном применении биопунктуры век.

Морфофункциональные изменения со стороны эпителиоцитов ресничного тела несомненно оказывают влияние как на степень фильтрации жидкости через трабекулу, так и на состав водянистой влаги. Так, расширение отростков ресничного тела может указывать на увеличение продукции водянистой влаги. Данное предположение подтверждается ультрамикроскопическими изменениями в клетках в виде обнаружения крупных размеров митохондрий, сложной интердигитации складок цитоплазматических мембран клеток, интенсивного развития цистерн зернистой эндоплазматической сети, что характерно для усиления секреторной деятельности ресничного тела.

Таким образом, фармакопунктура с использованием препаратов церебрум-композитум Н усиливает процессы трансэндотелиального обмена в капиллярах ресничного тела, его отростков и радужки глаз. Наиболее выраженная сосудистая реакция в исследованных оболочках глаза регистрируется при введении церебрум-композитум Н и практически отсутствует при внутривидеальной инъекции без введения каких-либо лекарственных средств.

Полагаем, что биопунктура гомотоксикологическим препаратом в условиях экспериментальной близорукости повышает уровень метаболических реакций иридоцилиарной системы, в условиях растяжения склеры восполняет адаптационные резервы, как за счет улучшения гемодинамических параметров сосудов ресничной мышцы, так и, вероятно, за счет восстановления баланса вегетативной иннервации.

Список литературы

1. *Агасаров Л.Г.* Фармакопунктура (фармакопунктурная рефлексотерапия). — М.: Арнебия, 2002. — С. 207.
2. *Акмаев И.Г.* и др. Руководство по гистологии. — СПб.: СпецЛит, 2001. — С. 495.

3. *Апрелев А.Е.* Клинико-экспериментальное обоснование и разработка метода фармакопунктуры в системе комплексной коррекции близорукости: Автореф. дисс. на соискание ученой степени д.м.н. — М., 2011. — С. 48.

4. *Галияхметов Р.Ф.* Динамика постожоговой регенерации роговицы при локальном и рефлексогенном воздействии аллогенным диспергированным биоматериалом: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — Екатеринбург, 2010. — С. 22.

5. *Де Беллис Массимо.* Руководство по биологической мезотерапии (гомеомезотерапии). — М.: Арнебия, 2004. — С. 1600.

6. *Лили Р.* Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Пер. с англ. В.В. Португалова. — М.: Мир, 1969. — С. 645.

7. *Обрубов С.А., Чарыева И.Г., Ильенко Л.И.* и др. Фармакопунктура: экспериментальное обоснование применения в офтальмологии // Российская педиатрическая офтальмология. — 2008. — №2. — С. 45—48.

8. *Обрубов С.А., Иванова А.О., Демидова М.Ю.* и др. Импульсное низкочастотное электромагнитное поле с позиций информационно-волновой технологии: от теории к практике в офтальмологии // Российская педиатрическая офтальмология. — 2010. — №1. — С. 52—56.

9. *Обрубов С.А., Ставицкая Г.В., Медведев И.Б., Древалев А.А.* и др. Экспериментальная офтальмология: морфологические основы новых технологий лечения. — М.: Бином, 2011. — С. 160.

10. *Обрубов С.А., Румянцев С.А., Юрова М.Ю.* и др. Влияние импульсного низкочастотного электромагнитного поля на аккомодационный ответ у детей при близорукости на фоне недифференцированной дисплазии соединительной ткани // Российская детская офтальмология. — 2012. — №1—2. — С. 43—48.

11. *Панкова Е.В.* Анализ, моделирование и алгоритмизация лечения детей с миопией методами физиотерапии: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — Воронеж, 2008. — С. 23.

12. *Avetisov E.S., Tarutta E.P., Iomdina E.N., Vinetskaya M.I., Andreyeva L.D.* Nonsurgical and surgical methods of sclera reinforcement in progressive myopia // Acta Ophthalmol. Scand. — 1997. — Vol. 75, №6. — P. 618—623.

13. *Ganesan P., Wildsoet C.* Pharmaceutical intervention for myopia control // Expert Rev. Ophthalmol. — 2010. — Vol. 5, №6. — P. 759—787.

14. *Meyer C., Mueller M.F., Duncker G.I., Meyer H.J.* Experimental animal myopia models are applicable to human juvenile-onset myopia // Surv. Ophthalmol. — 1999. — Vol. 44, №1. — P. 93—102.

Поступила 26.04.13

Сведения об авторах:

Порядин Геннадий Васильевич, д-р мед. наук, проф., член-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

Ставицкая Галина Васильевна, канд. биол. наук, Центр охраны зрения «Доктор Оптикус»

С.Б. Назаров^{1,2}, А.С. Иванова¹, А.А. Новиков¹

Продукция оксида азота у беременных крыс и особенности постнатального системогенеза у их потомства, развивавшегося при нарушении маточно-плацентарного кровообращения

¹ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 153012, Иваново, пр. Энгельса, 8

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н. Городкова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 153045, Иваново, ул. Победы, 8

Нарушение маточно-плацентарного кровообращения у белых крыс значительно снижает процент выживаемости потомства. Гиперфункция эритроцитарной системы и NO-зависимых механизмов регуляции в первые дни жизни крысят приводит в последствии к истощению их функциональных резервов.

Ключевые слова: оксид азота, беременность, гипоксия, системогенез

S.B. Nazarov^{1,2}, A.S. Ivanova¹, A.A. Novicov¹

Nitric oxide production at pregnant rats and feature postnatal systemogenesis at their posterity developing at insufficiency of disturbance of utero-placental blood circulation

¹ Ivanovo State Medical Academy, 8, Engels str., Ivanovo, 153462, Russia

² V.N. Gorodkov Ivanovo State Research Institute of Maternity and Childhood, 20, Pobeda str., Ivanovo, 153045, Russia

Disturbance of uteroplacental circulation at white rats considerably reduces percent of survival rate of posterity. Hyperfunction of erythrocyte system and NO-dependent mechanisms of regulation in the first days of pups' life results in an exhaustion of their functional reserves.

Key words: nitric oxide, pregnancy, hypoxia, systemogenesis

Нарушение маточно-плацентарного кровообращения (НМПК) является одним из ведущих факторов, приводящих к нарушению внутриутробного развития плода. Возникающие на фоне данной патологии изменения газового состава крови, трофики и метаболизма способствуют развитию внутриутробной гипоксии, приводящей к повреждению органов и систем плода, что является одной из причин перинатальной заболеваемости и смертности [4, 13]. Кроме того, хроническая кислородная недостаточность влечет за собой нарушение процессов адаптации плода к родам и переходу к внеутробным условиям существования [6].

Влияние НМПК на плод в настоящее время активно изучается. Наиболее адекватны для решения этих вопросов — экспериментальные исследования, в

связи с невозможностью проведения в клинике исследований на уровне органов и тканей [15].

В последние годы значительно возрос интерес к оксиду азота — соединению с широким спектром действия. Он может выступать фактором как патологическим, так и саногенеза при НМПК [14]. По данным литературы, в условиях кислородного голодания организма концентрация оксида азота и его метаболитов в крови меняется, что, по всей видимости, свидетельствует о переходе клеток на нитритно-нитратный способ дыхания [5].

Цель исследования — оценка состояния NO-зависимых механизмов у беременных крыс при экспериментальном НМПК и выявления особенности постнатального системогенеза у их потомства.

Методика

Исследования проведены на 228 белых беспородных крысах. В эксперименте использовано 43 плода белых крыс в возрасте 22 дней и 136 крысят в возра-

Для переписки: Иванова Анастасия Сергеевна, канд. мед. наук, ст. преп. кафедры нормальной физиологии ГБОУ ВПО «ИвГМА» Минздравсоцразвития России. E-mail: asivanova@mail.ru

сте 2, 15 и 30 дней после рождения. Первый день беременности регистрировался по обнаружению сперматозоидов во влагалищных мазках. Взрослые животные были разделены на 3 группы: 1-я — интактные беременные крысы-самки; 2-я — животные с НМПК; 3-я — ложнопериованные крысы-самки (контроль). Нарушения маточно-плацентарного кровообращения воспроизвели по методике М.М. Варгановой [3] путем перевязки части преплацентарного сосудистого пучка на 16-й день беременности, т.е. в тот период, когда плацентация уже завершена и плод полностью переходит на плацентарное кровообращение.

Использование в эксперименте плодов в возрасте 22 дней и крысят в возрасте 2, 15 и 30 дней после рождения связано с важностью этого периода жизни в становлении эритроцитарной системы.

На 22-е сут. беременности у самок определяли содержание эритроцитов, гемоглобина (унифицированными методами) и концентрацию суммарных нитратов и нитритов (NO_x) по методике Miranda K. [2001]. У плодов и крысят определяли массу тела и жизненно важных органов (сердца, головного мозга, печени, селезенки, почек). В крови определяли содержание эритроцитов и гемоглобина, показатель гематокрита. Состояние эритропоэза оценивали по содержанию ре-

Таблица 1

Динамика изменения концентрации NO_x , массы тела и жизненно важных органов у потомства белых крыс в норме и при НМПК

Показатели	Возраст	Контроль	НМПК
Концентрация NO_x (ммоль/л)	22-дневные плоды	194,3 ± 21,48	177,1 ± 23,66
	2-дневные	146,1 ± 13,12	343,8 ± 24,18*
	15-дневные	210,3 ± 31,15	196,5 ± 28,23
	30-дневные	244,5 ± 44,41	136,4 ± 30,26*
Масса тела (г)	22-дневные плоды	4,94 ± 0,12	4,79 ± 0,20
	2-дневные	5,75 ± 0,21	6,68 ± 0,30*
	15-дневные	20,74 ± 0,66	17,01 ± 1,11*
	30-дневные	35,01 ± 1,04	36,37 ± 1,10
Масса мозга (мг)	22-дневные плоды	205,7 ± 7,38	192,2 ± 5,72
	2-дневные	292,2 ± 8,55	276,9 ± 11,0
	15-дневные	1106,2 ± 22,1	1020,2 ± 59,3
	30-дневные	1306,0 ± 19,4	1330,6 ± 17,4
Масса печени (мг)	22-дневные плоды	325,7 ± 12,28	302,3 ± 16,96
	2-дневные	273,5 ± 9,97	263,9 ± 16,7
	15-дневные	613,3 ± 28,3	501,1 ± 36,5*
	30-дневные	1720,7 ± 74,9	1726,6 ± 80,85
Масса сердца (мг)	22-дневные плоды	29,32 ± 0,98	27,60 ± 1,01
	2-дневные	37,65 ± 1,59	37,64 ± 3,63
	15-дневные	118,1 ± 6,02	105,8 ± 8,04
	30-дневные	195,6 ± 3,97	211,64 ± 7,89*
Масса селезенки (мг)	22-дневные плоды	6,88 ± 0,52	5,94 ± 0,56
	2-дневные	26,25 ± 3,06	18,17 ± 2,82
	15-дневные	56,26 ± 3,48	42,82 ± 3,15*
	30-дневные	98,13 ± 4,73	120,5 ± 7,56*
Масса правой почки (мг)	22-дневные плоды	18,84 ± 1,01	17,08 ± 0,98
	2-дневные	38,25 ± 1,40	35,41 ± 2,39
	15-дневные	121,9 ± 4,17	100,4 ± 6,30*
	30-дневные	200,5 ± 4,47	229,1 ± 10,3*
Масса левой почки (мг)	22-дневные плоды	18,60 ± 0,82	17,13 ± 0,91
	2-дневные	37,72 ± 1,30	34,61 ± 2,50
	15-дневные	120,7 ± 4,97	95,73 ± 6,52*
	30-дневные	193,5 ± 3,75	220,0 ± 10,6*

Примечание. Здесь и далее * — достоверное отличие от контрольных значений ($p < 0,05$).

тикулоцитов в крови, эритроидных клеток в органах кроветворения (печень, селезенка, красный костный мозг). Определяли диаметр эритроцитов с использованием анализатора изображений «Видео-Тест» с компьютерной программой Global Lab Image. Концентрацию суммарных нитратов и нитритов (NO_x) оценивали по методике Miranda K. [2001].

Эвтаназия взрослых животных производилась под нембуталовым наркозом (50 мг/кг) путем дислокации шейных позвонков, крысят — под эфирным наркозом путем декапитации.

Статистическая обработка данных проведена методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В исследуемых показатели взрослых крыс, а также плодов и крысят 1-й и 3-й групп существенных различий не выявлено.

При НМПК у взрослых животных содержание эритроцитов и гемоглобина существенно не меняется. В сыворотке крови достоверно снижается концентрация NO_x от $242,7 \pm 23,86$ ммоль/л в 1-й группе до $165,6 \pm 8,36$ ммоль/л в 3-й группе. Нарушение продукции NO можно объяснить возникновением при перевязке преаортального сосудистого пучка эндотелиальной дисфункции, связанной с облитерацией части сосудов на фоне гипоксии плода. В усло-

виях снижения синтеза оксида азота происходит повреждение эндотелиоцитов, нарушается реология крови, повышается активность ангиотензина, что в совокупности приводит к нарушению микроциркуляции, возникновению многоочаговой тканевой гипоксии, которая еще более усугубляет степень повреждения сосудов и сопряженных с этим осложнений у плода [1].

При анализе продукции оксида азота в постнатальном онтогенезе на фоне НМПК выявлено повышение его образования у 2-дневных крысят (табл. 1). Однако в дальнейшем содержание нитритов в крови животных постепенно снижается и на 15-е сут. имеет значения сходные с таковыми у крысят интактных беременных самок. К 30-м сут. концентрация нитритов в крови крысят 2-й группы существенно снижается по сравнению с контролем, что может свидетельствовать об истощении функциональных резервов NO-зависимых механизмов регуляции.

НМПК существенно снижает процент выживаемости потомства у белых крыс: в случае НМПК этот показатель составляет 41%, тогда как в контроле он равен 64%.

При оценке массы тела и жизненно важных органов установлено, что у плодов и 2-дневных крысят, развивавшегося при НМПК, отмечаются сходные с контролем показатели массы тела и жизненно важных органов, что можно объяснить активацией ком-

Таблица 2

Состояние эритроцитарной системы у потомства белых крыс в норме и при НМПК

Показатели	Возраст	Контроль	НМПК
Концентрация эритроцитов (Т/л)	22-дневные плоды	$1,64 \pm 0,07$	$1,72 \pm 0,14$
	2-дневные	$2,71 \pm 0,33$	$3,42 \pm 0,31$
	15-дневные	$3,42 \pm 0,17$	$3,73 \pm 0,19$
	30-дневные	$5,64 \pm 0,14$	$4,81 \pm 0,15^*$
Концентрация гемоглобина (г/л)	22-дневные плоды	$86,88 \pm 2,77$	$89,04 \pm 4,47$
	2-дневные	$100,0 \pm 1,75$	$102,1 \pm 3,47$
	15-дневные	$91,26 \pm 1,79$	$92,35 \pm 1,73$
	30-дневные	$113,9 \pm 2,29$	$92,0 \pm 4,45^*$
Концентрация ретикулоцитов (%)	22-дневные плоды	$928,1 \pm 6,32$	$966,5 \pm 4,15^*$
	2-дневные	$491,1 \pm 24,8$	$548,5 \pm 31,5$
	15-дневные	$174,3 \pm 10,4$	$289,3 \pm 25,1^*$
	30-дневные	$91,33 \pm 14,9$	$91,93 \pm 9,66$
Содержание эритроидных клеток в красном костном мозге (%)	22-дневные плоды	$6,00 \pm 0,98$	$8,72 \pm 0,69^*$
	2-дневные	$15,62 \pm 1,36$	$23,71 \pm 1,32^*$
	15-дневные	$25,50 \pm 1,28$	$20,06 \pm 0,07^*$
	30-дневные	$34,77 \pm 2,02$	$35,28 \pm 2,01$
Содержание эритроидных клеток в печени (%)	22-дневные плоды	$26,17 \pm 1,02$	$29,76 \pm 1,35^*$
	2-дневные	$19,21 \pm 1,37$	$23,50 \pm 1,52^*$
	15-дневные	$2,24 \pm 0,36$	$1,06 \pm 0,26^*$
	30-дневные	$0,00 \pm 0,00$	$0,14 \pm 0,10$

пенсаторно-приспособительных механизмов и гиперфункцией органов в ответ на воздействие гипоксии (табл. 1). К 15-му дню жизни выявляется уменьшение основных соматометрических показателей. К 30-му дню, как правило, у животных 2-й группы нами отмечена тенденция к возрастанию массы органов. По данным литературы, в постнатальном онтогенезе при НМПК продукция соматотропного гормона, гормонов щитовидной железы, инсулиноподобного фактора роста IGF-1 достоверно не меняется по сравнению с интактными животными [12]. Активность NO-зависимых процессов при задержке внутриутробного развития является одним из ведущих патогенетических факторов, так как оксид азота влияет на рост мышечной ткани и адипоцитов [10]. В то же время, хроническая гипоксия изменяет работу генов, ответственных за рост практически всех органов и тканей [9, 11].

При НМПК происходят преобразования в эритроцитарной системе потомства белых крыс (табл. 2). Известно, что хроническая внутриутробная гипоксия плода, как правило, сопровождается усилением процессов гемопоэза. Анализ полученных нами данных показал, что у плодов и крысят в возрасте 2 и 15 дней концентрация эритроцитов, гемоглобина и показатель гематокрита имели значения сходные с таковыми у контрольных животных. Реакция крови на гипоксию не всегда обнаруживает заметные изменения показателей периферической крови, что может быть связано с ацидотической альтерацией красных клеток у крысят после НМПК [7]. Кроме того, возникновение ацидоза в условиях дефицита кислорода стимулирует взаимодействие макрофагов с эритроцитами, активируя их фагоцитоз [8]. Наблюдаемая на 30-й день эритропения, снижение концентрации гемоглобина и гематокрита у животных, развивавшихся при НМПК, скорее всего, связаны с гиперфункцией эритроцитарной системы в пренатальном и ранний постнатальный периоды жизни, что в конечном итоге привело к истощению ее функциональных резервов.

НМПК приводит к возрастанию среднего диаметра эритроцитов у плодов. Напряженность процессов эритропоэза приводит к тому, что у крысят 2-й группы на 30-е сутки развивается микроцитоз.

Исследование состояния кроветворения показало, что НМПК приводит к развитию выраженного ретикулоцитоза у плодов и 15-дневных крысят (табл. 2). Значительное возрастание концентрации ретикулоцитов в крови плодов данной экспериментальной группы, по всей видимости, свидетельствует об интенсивном процессе эритропоэза. В то же время, выраженный ацидоз, которым сопровождается хроническая внутриутробная гипоксия, может способствовать бы-

строму разрушению эритроцитов, а продукты разрушения красных клеток крови являются одним из главных факторов регулирующих эритропоэз [2]. Наличие ретикулоцитоза у 15-дневных крысят после НМПК может быть связано с некоторым замедлением созревания ретикулоцитов, что является негативным следствием воздействия внутриутробной гипоксии.

Анализ состояния кроветворения в печени, которая является основным плацдармом кроветворения в данный период онтогенеза, показал, что во внутриутробный период и у 2-дневных крысят после НМПК его уровень находится на достаточно высоком уровне и превышает его контрольные значения. 15-й день жизни крысят 2-й группы сопровождается значительным снижением темпов кроветворения в печени. На 30-е сут. постнатального онтогенеза содержание эритроидных клеток в этом органе у животных обеих экспериментальных групп находится на одинаково низком уровне, что указывает на прекращение эритропоэза в печени.

Как показали наши исследования, НМПК способствует интенсификации кроветворения в красном костном мозге плодов и 2-дневных крысят. Так количество эритроидных клеток в мазках красного костного мозга в случае аномальной беременности было достоверно выше, чем в контроле. Однако уже у 2-дневных крысят активность медуллярного кроветворения практически не отличается от уровня контроля. К 15-м сут. жизни интенсивность эритропоэза в красном костном мозге у крысят 2-й группы уменьшается и становится достоверно ниже контрольных значений. На 30-е сут. постнатального онтогенеза темпы медуллярного кроветворения в 1-й и 2-й экспериментальных группах имели сходные значения и практически не различались между собой. Достоверные различия в темпах эритропоэза в селезенке отсутствовали.

Таким образом, НМПК у белых крыс значительно снижает процент выживаемости потомства. Кроме того, внутриутробная гипоксия способствует мобилизации функциональных резервов эритроцитарной системы в пренатальный и первые дни постнатального периода жизни потомства белых крыс, которые проявляются в виде усиления процессов эритропоэза в красном костном мозге и печени. Это, в свою очередь, приводит к увеличению концентрации ретикулоцитов. В ответ на возникшую гипоксию отмечается активация NO-зависимых механизмов регуляции физиологических функций, которая проявляется в виде гиперпродукции оксида азота. Гиперфункция эритроцитарной системы и NO-зависимых механизмов регуляции в первые дни жизни крысят приводит в последствии к истощению их функциональных резервов.

Список литературы

1. **Белокриницкая Т.Е., Казанцева Е.В., Витковский Ю.А.** Некоторые патогенетические механизмы развития нарушений в фетоплацентарной системе у пациенток с артериальной гипертензией // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. — 2005. — Т. 1. — С. 12—16.
2. **Белокриницкая Т.Е., Кузник Б.И., Хавинсон Х.В.** Влияние полипептидов эритроцитов на систему эритрона при экспериментальной анемии // Бюлл. exper. биологии и медицины. — 1992. — №8. — С. 132—134.
3. **Вартамова М.М.** Патогенез и профилактика синдрома отставания в развитии плода при плацентарной недостаточности и его отдельные последствия: Автореф. дисс. на присуждение ученой степени д.м.н. — Л., 1984.
4. **Полячкова О.Л., Бордули Г.М.** Клинико-биохимические критерии диагностики задержки развития плода // Акушерство и гинекология. — 2009. — №2. — С. 34—36.
5. **Реутов В.П., Каюшин Л.П., Сорокина Е.Г.** Физиологическая роль окиси азота в организме животных // Физиология человека. — 1994. — Т. 20, №3. — С. 165—174.
6. **Сидорова И.С., Марков И.О.** Фетоплацентарная недостаточность. Клинико-диагностические аспекты. — М.: Знание. — 2000. — 127 с.
7. **Торубарова Н.А., Кошель И.В., Яцык Т.В.** Кровотворение плода и новорожденного. — М.: Медицина. — 1993. — 207 с.
8. **Biondi C., Cotorruelo C., Ensinck A.** et al. Senescent erythrocytes: factors affecting the aging of red blood cells // Immunol. Invest. — 2002. — Vol. 31, №1. — P. 41—50.

9. **Fowden A.L., Giussani D.A., Forhead A.J.** Endocrine and metabolic programming during intrauterine development // Early Hum. Dev. — 2005. — Vol. 81. — P. 723—734.

10. **Fu W., Haynes T.E., Kohli R.** et al. Dietary L-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats // J. Nutr. — 2005. — Vol. 135. — P. 714—721.

11. **Huang S.-T.J., Vo K.C.T., Lyell D.J.** et al. Developmental response to hypoxia // FASEB. — 2004. — Vol. 18. — P. 1348—1365.

12. **Houdijk E.C.A.M., Engelbregt M.J.T., Popp-Snijders C., Delemarrevd Waal H.A.** Endocrine regulation and extended follow up of longitudinal growth in intrauterine growth-retarded rats // Journal of Endocrinology. — 2000. — Vol. 166. — P. 599—608.

13. **Nusken K.-D., Dotsch J., Rauh M.** et al. Uteroplacental Insufficiency after Bilateral Uterine Artery Ligation in the Rat: Impact on Postnatal Glucose and Lipid Metabolism and Evidence for Metabolic Programming of the Offspring by Sham Operation // Endocrinology. — 2008. — Vol. 149, №3. — P. 1056—1063.

14. **Rosselli M., Keller P.J., Dubey R.K.** Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction // Hum. Reprod. Update. — 1998. — №4. — P. 3—24.

15. **Wu G., Bazer F.W., Wallace J.M., Spencer T.E.** Intrauterine growth retardation: Implications for the animal sciences // J. Anim. Sci. — 2006. — Vol. 84. — P. 2316—2337.

Поступила 23.10.12

Сведения об авторах:

Назаров Сергей Борисович, д-р мед. наук, проф., зам. дир. по науке ФГБУ «Ивановский НИИМиД им. В.Н. Горюкова» Минздрава РФ, зав. кафедрой нормальной физиологии ГБОУ ВПО «ИВГМА» Минздрава РФ
Новиков Александр Анатольевич, аспирант каф. нормальной физиологии ГБОУ ВПО «ИВГМА» Минздрава РФ

Н.Э. Ордян, Ю.О. Федотова, С.Г. Пивина, В.К. Акулова

Влияние флуоксетина и пароксетина на тревожное поведение молодых и взрослых пренатально стрессированных самцов крыс

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

Проведен сравнительный анализ действия селективных ингибиторов обратного захвата серотонина — флуоксетина и пароксетина на тревожное поведение у пренатально стрессированных самцов крыс в период пубертата (1,5 мес.) и у половозрелых (3 мес.) крыс. Препараты вводили в дозе 5,0 мг/кг, перорально с 1-х по 14-е сут. постнатального периода жизни. Хроническое введение пароксетина не изменяло тревожное поведение у пренатально стрессированных крыс независимо от возраста. Напротив, введение флуоксетина оказывало модулирующее влияние на тревожное поведение пренатально стрессированных крыс в зависимости от возрастного фактора: у молодых самцов крыс отмечался анксиолитический эффект, тогда как у взрослых — ангиогенный эффект.

Ключевые слова: возраст, пароксетин, пренатальный стресс, самцы, тревожность, флуоксетин

N.E. Ordyan, S.G. Pivina, Yu.O. Fedotova, V.K. Akulova

Influence of fluoxetine and paroxetine on anxiety-like behavior in young and adult prenatally stressed male rats

Institute of Physiology I.P. Pavlov RAS, 6, Nab. Makarova, St. Petersburg, 199034, Russia

The aim of the present work was an estimation of effects of chronic administration of selective serotonin reuptake inhibitors — fluoxetine (5,0 mg/kg, p.o.) and paroxetine (5,0 mg/kg, p.o.) for 14 days of postnatal period on anxiety-like behavior in the prenatally stressed male rats during pubertal period (1,5 month) and the adult state (3 month). Chronic paroxetine administration to females failed to change an anxiety-like behavior independently from age. On the contrary, administration of fluoxetine resulted in modulating influence on the anxiety-like behavior of prenatally stressed rats dependently from age: anxiolytic effect was noted in young males, while anxiogenic effect was observed in the adult male rats.

Key words: age, anxiety, fluoxetine, male rats, paroxetine, prenatal stress

В последние годы обращают на себя внимание исследования, направленные на определение роли пренатального стрессорного воздействия во время беременности в последующем развитии в постнатальный период когнитивно-аффективных расстройств [3, 4, 8]. Стресс, который матери переживали во время беременности, вызывает у экспериментальных животных психоэмоциональные отклонения [10]. У подопытных крысят после пренатального стрессирования матерей выявлены иммунные и неврологические расстройства [5], а также изменение нейроэндокринной регуляции репродукции и стресс-реактивности [6, 9]. Пренатальный стресс матерей приводит к психоэмоциональным расстройствам у потомства, особенности и степень выраженности которых зависят от пола и сроков воздействия [4, 10]. В ли-

тературе имеются данные об изменении функционального состояния серотонинергической системы у потомства крыс, переживших пренатальный стресс, что является возможным механизмом предрасположенности к стрессорным нарушениям эмоционально-мотивационной сферы [7]. Однако в настоящее время полностью отсутствуют какие-либо сведения, как в отечественной, так и в зарубежной литературе о методах фармакологической коррекции и профилактики последствий материнского стресса у потомства мужского и женского пола. Кроме того, в данной ситуации, по-видимому, весьма важно учитывать определенные критические периоды их постнатального развития, когда возможно эффективное фармакологическое вмешательство.

Цель исследования — оценка отсроченных эффектов селективных ингибиторов обратного захвата с разным механизмом действия на поведенческий статус пренатально стрессированных самцов крысят в период пубертата и во взрослом состоянии.

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

Методика

В работе было использовано потомство от 14 первородящих самок крыс линии Спрег—Доули (Колтуши, Россия), которых содержали в стандартных условиях вивария с неограниченным доступом к воде и пище. Моделирование пренатального стресса осуществляли следующим образом: беременных самок ($n = 11$) с 15 по 18 сут. гестации подвергали ежедневному иммобилизационному стрессу в узких пластиковых пеналах размером $20 \times 7 \times 6$ см в условиях повышенной освещенности [9]. Контрольных беременных самок ($n = 3$) оставляли интактными. Полученное от интактных беременных самок нестрессированное потомство в количестве 11 особей представляло собой контрольную группу самцов крыс, получавших физиологический раствор (группа 1). Полученное от беременных самок пренатально стрессированное потомство мужского пола было разделено на следующие группы по 11—12 особей в каждой: 2-я группа — пренатально стрессированные самцы, получавшие физиологический раствор; 3-я группа — пренатально стрессированные самцы, получавшие пароксетина гидрохлорид (СмитКляйн Бичем Фармасьютикалз, Франция) в дозе 5,0 мг/кг; 4-я группа — пренатально стрессированные самцы, получавшие флуоксетина гидрохлорид (Сигма, США) в дозе 5,0 мг/кг. Пероральное введение физиологического раствора и ингибиторов обратного захвата серотонина осуществляли с 1-х по 14-е сут. постнатального периода жизни.

Поведенческие тесты были выполнены по достижению крысятами возраста 1,5-а (пубертатный период) или 3 мес. (половозрелые). Всех животных за неделю до эксперимента ежедневно брали в руки с целью адаптации к экспериментатору. Уровень тревожности самцов крыс оценивали в тесте приподнятый крестообразный лабиринт [2]. Характер поведенческих реакций, таких, как общая двигательная активность (горизонтальная и вертикальная) и продолжительность груминга определяли в тесте «открытое поле» [1].

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием двухфакторного дисперсионного анализа с последующим Dunnett's post-hoc тестом с помощью пакета программ SPSS 9.0. Различия между значениями при $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты и обсуждение

В тесте приподнятый «крестообразный» лабиринт были обнаружены значимые различия во влиянии пренатального стресса на тревожное поведение в зависимости от возраста крысят (рис. 1 А,Б). Так, в возрасте 1,5 мес. пренатальный стресс оказывал анксиогенное действие на тревожное поведение самцов, что выразилось в снижении времени пребывания в «открытых» рукавах и количества заходов в эти рукава

(рис. 1 А,Б) по сравнению с соответствующим контролем (группа 1). В то же время, в возрасте 3-мес. пренатальный стресс проявлял анксиолитическое действие на тревожное поведение самцов, что выражалось в повышении времени пребывания в «открытых» рукавах и количества заходов в эти рукава (рис. 1 А,Б) по сравнению с соответствующим контролем.

Введение пароксетина крысятам независимо от возраста (1,5 или 3 мес.) не влияло на показатели тревожного поведения по сравнению с группами пренатально стрессированных животных, получавших физиологический раствор в возрасте 1,5 или 3 мес. Введение флуоксетина 1,5-месячным крысятам приводило к достоверному увеличению времени пребывания в «открытых» рукавах и числа заходов в эти рукава по сравнению с группой пренатально стрессированных животных (груп-

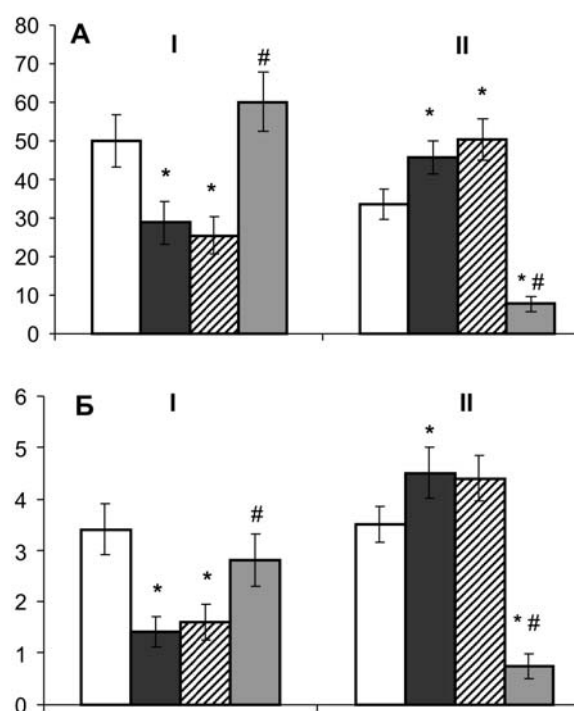


Рис. 1. Влияние флуоксетина и пароксетина на тревожное поведение пренатально стрессированных самцов крыс: I — в возрасте 1,5 мес.; II — в возрасте 3 мес.

А: ось X — группы животных; ось Y — время нахождения животного в открытых рукавах (с);

Б: ось X — группы животных; ось Y — количество заходов животного в открытые рукава (раз).

Светлые столбики — контрольные самцы, получавшие растворитель (контроль 1); темные столбики — пренатально стрессированные самцы, получавшие растворитель (контроль 2); столбики с косой штриховкой — пренатально стрессированные самцы, получавшие пароксетин, светло-серые столбики — пренатально стрессированные самцы, получавшие флуоксетин.

* — $p < 0,05$, достоверное отличие от соответствующих контрольных самцов в возрасте 1,5 или 3 мес. (контроль 1); # — $p < 0,05$, достоверное отличие от соответствующих пренатально стрессированных самцов в возрасте 1,5 или 3 мес. (контроль 2). Данные представлены в виде $M \pm m$, количество животных в группах — $N = 11-12$.

па 2), что свидетельствует об анксиолитическом эффекте данного препарата (рис. 1 А,Б). Однако введение флуоксетина половозрелым пренатально стрессированным самцам достоверно понижало время нахождения в «открытых» рукавах и число заходов в эти рукава по сравнению с контрольной группой крыс в возрасте 3 мес. (группа 1) и группой пренатально стрессирован-

ных животных в возрасте 3 мес. (группа 2), что указывает на анксиогенный эффект препарата (рис. 1).

В тесте «открытое поле» было выявлено, что пренатальный стресс независимо от возрастного фактора достоверно повышал горизонтальную двигательную активность и не оказывал какого-либо влияния на вертикальную двигательную активность и продолжительность груминга по сравнению с соответствующими контрольными группами крыс (рис. 2). Введение пароксетина существенно понижало вертикальную двигательную активность у крысят в период пубертата по сравнению с группой 1,5 мес. пренатально стрессированных крыс, а также горизонтальную двигательную активность у 3-мес. пренатально стрессированных самцов в тесте «открытое поле» по сравнению с группой половозрелых пренатально стрессированных крыс (рис. 2 А,Б). Хроническое введение флуоксетина у половозрелых самцов снижало горизонтальную двигательную активность по сравнению с группой пренатально стрессированных крыс (рис. 2А). Наряду с этим отмечалось статистически значимое увеличение продолжительности груминга у половозрелых пренатально стрессированных самцов крыс по сравнению с соответствующей контрольной группой крыс (группа 1) и группой 3 мес. пренатально стрессированных животных (группа 2) (рис. 2В). Следует отметить, что введение флуоксетина не меняло параметры поведенческих реакций в тесте «открытое поле» у крысят в период пубертата по сравнению с группой 1,5 мес. пренатально стрессированных самцов.

Проведенные исследования выявили, что действие пренатального стресса на тревожное поведение самцов крыс детерминировано возрастным фактором: в период пубертата — уровень тревожности повышен, тогда как уже во взрослом состоянии — уровень тревожности снижен, т.е. происходит инверсия его действия. Кроме того, можно говорить о том, что такие эффекты пренатального стресса обусловлены именно его воздействием на механизмы формирования тревожного поведения, а не связаны с его влиянием на двигательную или эмоциональную активность, поскольку не выявлено соответствия между данными, полученными в тесте «открытое поле» и данными, полученными в тесте приподнятый «крестообразный лабиринт». Наряду с этим невозможно однозначно утверждать, что такие эффекты пренатального стресса являются позитивными или негативными, поскольку показатели пренатально стрессированных крыс уже выходят за рамки контрольных значений.

Фармакологический анализ влияния селективных ингибиторов обратного захвата серотонина позволили выявить ряд весьма интересных закономерностей в их действии на характер тревожного поведения самцов крыс в зависимости от возрастного фактора. Прежде всего, необходимо отметить, что пароксетин не оказывает какого-либо эффекта на тревожное поведение прена-

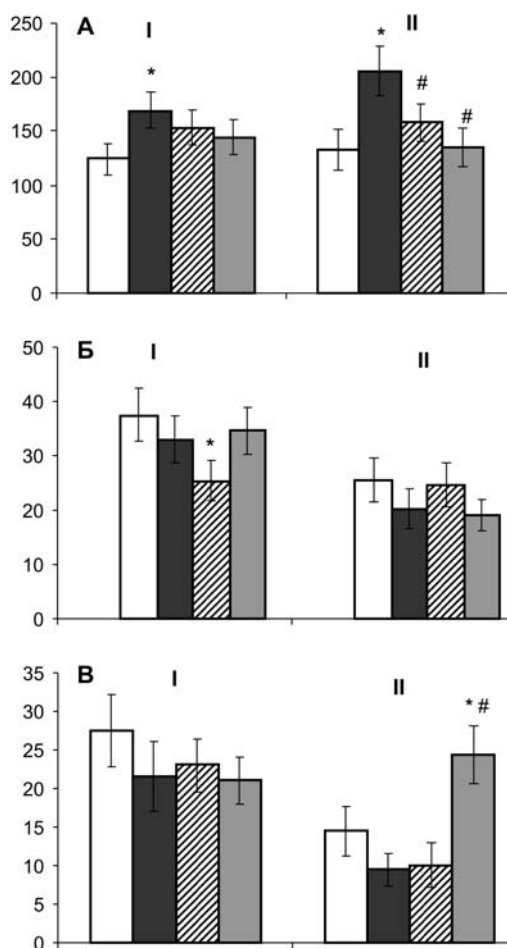


Рис. 2. Влияние флуоксетина и пароксетина на поведение пренатально стрессированных самцов крыс I — в возрасте 1,5 мес.; II — в возрасте 3 мес. в тесте «Открытое поле».

А: ось X — группы животных; ось Y — горизонтальная двигательная активность (раз);

Б: ось X — группы животных; ось Y — вертикальная двигательная активность (раз);

В: ось X — группы животных; ось Y — продолжительность груминга (с). Светлые столбики — контрольные самцы, получавшие растворитель (контроль 1), темные столбики — пренатально стрессированные самцы, получавшие растворитель (контроль 2), столбики с косой штриховкой — пренатально стрессированные самцы, получавшие пароксетин, светло-серые столбики — пренатально стрессированные самцы, получавшие флуоксетин.

* — $p < 0,05$, достоверное отличие от соответствующих контрольных самцов в возрасте 1,5 или 3 мес. (контроль 1); # — $p < 0,05$, достоверное отличие от соответствующих пренатально стрессированных самцов в возрасте 1,5 или 3 мес. (контроль 2). Данные представлены в виде $M \pm m$, количество животных в группах — $N = 11-12$.

тально стрессированных самцов независимо от их возраста. Совершенно иная картина получена при введении флуоксетина. Поведенческие эффекты флуоксетина на тревожное поведение пренатально стрессированных самцов строго детерминированы возрастным фактором и его эффекты имеют модулирующий характер. Так, полученные данные демонстрируют, что флуоксетин снижает уровень тревожности у 1,5-месячных пренатально стрессированных крыс до контрольных значений, когда уровень тревожности повышен, и наоборот, данный препарат повышает уровень тревожности у 3-месячных пренатально стрессированных самцов даже ниже контрольных значений, когда уровень тревожности низкий. Выявленная закономерность в эффекте флуоксетина свидетельствует о том, что этот препарат оказывает модулирующее влияние на тревожное поведение пренатально стрессированных самцов крыс, в результате чего независимо от его анксиогенного или анксиолитического эффекта достигается нивелирование действия пренатального стресса на тревожное поведение самцов крыс. Можно говорить о том, что флуоксетин полностью устраняет эффекты пренатального стресса в зависимости от возраста, оказывая корректирующее воздействие на изначально измененное, вследствие пренатального стресса, тревожное поведение, нормализуя его до уровня контрольных животных. Следует также отметить, что поведенческие эффекты как пароксетина, так и флуоксетина не связаны с их влиянием на поведение в тесте «открытое поле».

В настоящее время невозможно сделать точного и однозначного заключения о механизмах действия селективных ингибиторов обратного захвата серотонина на тревожное поведение у стрессированных пренатально самцов крыс в зависимости от возрастного фактора. Выявленные эффекты исследуемых нами селективных ингибиторов обратного захвата серотонина на модели пренатального стресса у самок могут быть обусловлены уже измененной функциональной активностью нейромедиаторных систем вследствие стресса, в результате чего фармакологические эффекты данных препаратов реализуются противоположным образом в отличие от их эффектов в отсутствии пренатального стресса.

Тем не менее, результаты данного пилотного исследования свидетельствуют о целесообразности дальнейшего проведения исследований отсроченных эффектов флуоксетина и пароксетина на тревожное поведение у пренатально стрессированных крыс.

Список литературы

1. *Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж.П.* Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. — М.: Высшая школа, 1991. — 399 с.
2. *Воронина Т.А., Середенин С.Б.* Методические указания по изучению транквилизирующего (анксиолитического) действия фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М.: ИИА Ремедиум. — 2000. — С. 126—130.
3. *Резников А.Г., Пишак В.П., Носенко Н.Д.* и др. Пренатальный стресс и нейроэндокринная патология. — Черновцы: Медакадемия. — 2004. — 320 с.
4. *Резников А.Г., Носенко Н.Д., Тарасенко Л.В.* и др. Ранние и отдаленные нейроэндокринные эффекты пренатального стресса // Пробл. эндокрин. — 2000. — Т. 46. — С. 34—38.
5. *Avaliani T.V., Tsukanov S.G., Belobokova N.K.* Immune and motor disorders of the offspring from female rats-ambidextreous following psychogenic stress // Psychopharmacol. Biol. Narcol. — 2004. — Vol. 4. — P. 692.
6. *Belobokova N.K., Avaliani T.V., Fedorova O.R.* et al. Offspring behaviour character burn from female rats survived psychogenic trauma // Psychopharmacol. Biol. Narcol. — 2004. — Vol. 4. — P. 767—768.
7. *Ishiwata H., Shiga T., Okado N.* Selective serotonin reuptake inhibitor treatment of early postnatal mice reverses their prenatal stress-induced brain dysfunction // Neurosci. — 2005. — Vol. 4. — P. 893—901.
8. *Papakostas G.I.* Tolerability of modern antidepressants // J. Clin. Psychiatry. — 2008. — Vol. 69. — P. 8—13.
9. *Pivina S.G., Akulova V.K., Ordayn N.E.* Changed activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in prenatally stressed female rat during aging // Bull. Exp. Biol. Med. — 2007. — Vol. 143. — P. 740—743.
10. *Weinstock M.* Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring // Prog. Neurobiol. — 2001. — Vol. 65. — P. 427—451.

Поступила 12.09.12

Сведения об авторах:

Пивина Светлана Геннадьевна, канд. биол. наук, старш. науч. сотр. лаб. нейроэндокринологии ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН

Ордян Наталья Эдуардовна, д-р биол. наук, зав. лаб. нейроэндокринологии ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН

© Коллектив авторов, 2013
УДК 543.51

Э.Д. Вирюс, А.В. Иванов, Б.П. Лузянин, А.А. Пальцын, А.А. Кубатиев

Масс-спектрометрия в биологии и медицине XXI века

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

Эта статья для тех, кто впервые сталкивается с масс-спектрометрией в аналитической практике, но по понятным причинам не хотят относиться к масс-спектрометрам, как к «черным ящикам». В статье упоминаются все масс-анализаторы, нашедшие применение в аналитической практике. Огромная потребность аналитической практики в высокочувствительных и селективных способах детектирования стимулировала привлечение разнообразных масс-анализаторов масс-спектрометрическими лабораториями. Выбор масс-анализатора определяется концентрациями аналитов, требованиями к пределам детектирования и составом анализируемой матрицы.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, масс-анализаторы, квадрупольная масс-спектрометрия, орбитальная ионная ловушка, время-пролетная масс-спектрометрия

E.D. Virus, A.V. Ivanov, B.P. Luzyanin¹, A.A. Paltsyn, A.A. Kubatiev¹

Mass-spectrometry in biology and medicine of XXI Century

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

This article for those who faces for the first time with mass spectrometry, but for obvious reasons they don't want to refer to mass spectrometers as to «black boxes». In this article all mass spectrometers which are used in analytical practice are mentioned. The huge need of analytical practice for very sensitive and selective methods of detection have stimulated the attraction of various mass analyzers by mass spectral laboratories. The concentration of analytes, requirements for limit of detection and sample content define the choice of the device.

Key words: mass spectrometry, mass analyzers, ion trap mass spectrometry, quadrupole mass spectrometry, orbitrap, time-of-flight mass spectrometry

Квадрупольный масс-спектрометр

Самым распространенным масс-спектрометрическим методом в аналитической химии все еще остается газовая хроматография и ВЭЖХ с масс-спектрометрическим анализатором.

Квадрупольный масс-анализатор был сконструирован Вольфгангом Паулем в 1953 г. [17]. Этот масс-анализатор стал результатом его теоретических и экспериментальных исследований по удерживанию и разделению ионов в двухмерных и трехмерных квадрупольных электрических полях. В 1989 г. ему была присуждена нобелевская премия за разработку квадрупольной ионной ловушки [16]. Хотя для первых квадрупольных масс-анализаторов было характерно низкое разрешение и небольшой диапазон сканирования, они стали широко применяться в масс-спектрометрических лабораториях благодаря своей высокой скорости сканирования. [6]. У современных квадрупольных масс-анализаторов диапазон

сканирования составляет 4000 m/z и является своего рода золотым стандартом в жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Квадрупольные масс-анализаторы обладают следующими достоинствами:

- 1) высокая пропускная способность ионов;
- 2) небольшой вес (они очень компактны и стоят относительно недорого);
- 3) низкое ускоряющее напряжение;
- 4) относительно высокая скорость сканирования, так как осуществляется быстрое изменение электрических потенциалов.

Линейный квадрупольный масс-анализатор состоит из четырех параллельных гиперболических или цилиндрических электродов, вытянутых вдоль оси z . Собранные вместе они образуют конфигурацию с прямоугольным сечением (xy -плоскость, рис. 1). К попарно соединенным противостоящим электродам прикладывается потенциал, имеющий постоянную и переменную составляющую. Благодаря ускоряющему напряжению ионы оказываются в квадруполье, где под действием осциллирующего поля, создаваемого электродами, они начинают колебаться вдоль оси x и y (рис. 2). При этом направление движения ионов

Для корреспонденции: Вирюс Эдуард Даниэлевич, канд. хим. наук, вед. науч. сотр., лаб. функциональной протеомики и метабономики ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: edwardvirus@yandex.ru

вдоль оси z не меняется. При этом значительно меняется амплитуда их колебаний. Амплитуда колебаний ионов будет зависеть от m/z ионов и потенциалов на электродах. Ионы, чьи амплитуды достигают высоких значений, нейтрализуются при столкновениях с электродами. В таких случаях говорят, что траектории таких ионов неустойчивы. Ионы с устойчивыми траекториями проходят через весь квадруполь и долетают до детектора. Для того, чтобы ионы с определенной m/z имели стабильную траекторию задают фиксированное соотношение постоянной и переменной составляющей потенциала. Управление потенциалами позволяет получать полный масс-спектр или детектировать отдельный ион.

Таким образом, разделение основано на различии в стабильности траекторий движения заряженных частиц в осциллирующем электрическом поле. До настоящего времени газовая хроматография — квадрупольная масс-спектрометрия является самым распространенным методом в аналитических лабораториях. Тем не менее, недостатки квадрупольных масс-спектрометров (низкое разрешение и точность определения масс) стимулировали исследователей к поиску альтернативных масс-спектрометрических методов.

Квадрупольная ионная ловушка

Разновидностью квадрупольных масс-спектрометров являются масс-спектрометры с ионной ловушкой. Масс-спектрометрия с квадрупольной ионной ловушкой была разработана Паулем в 1953 г., хотя ее аналитический потенциал начали использовать в полной мере только с середины 80-х годов прошлого века. Первые масс-спектрометры с квадрупольной ионной ловушкой предлагались только в сочетании с газовыми хроматографами. В первых коммерческих ионных ловушках электронная ионизация осуществлялась в самой ловушке. Газ-носитель из хроматографа также поступал непосредственно в ионную ловушку. Позже стали доступны внешние источники ионов. Было разработано большое число способов ионизации для ионных ловушек. В последнее время они получили большое распространение в медицине [1—4]. У современных квадрупольных ионных ловушек диапазон сканирования достигает 3000 m/z . Однако относительно высокое разрешение может достигаться при низкой скорости сканирования на узком диапазоне масс детектируемых ионов (в англоязычной литературе этот режим сканирования известен как «*zoom scan*»). Самым важным достоинством квадрупольных ионных ловушек — это возможность проводить эксперименты с применением метода tandemной масс-спектрометрии. Метод tandemной во времени масс-спектрометрии, осуществляемый в квадрупольных ионных ловушках, позволяет эффективно проводить MSⁿ эксперименты, т.е. выпол-

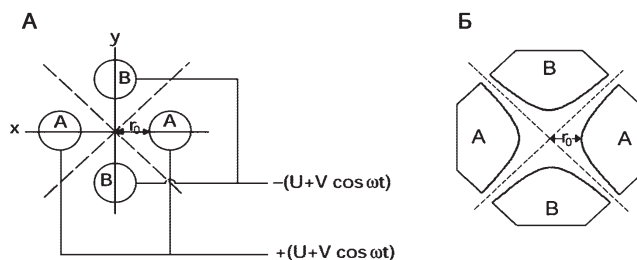


Рис. 1. Поперечное сечение квадруполя: А — для цилиндрического приближения; Б — для гиперболического профиля стержней. Электрическое поле равно нулю вдоль пунктирных линий, т.е. вдоль асимптот на рис. Б [6].

нить несколько стадий изолирования, фрагментирования и разделения ионов. Квадрупольная ионная ловушка состоит из двух концевых электродов, имеющих полугиперболическую форму, и одного кольцевого электрода, условно похожего на два электрода в линейном квадрупольном масс-анализаторе (рис. 3). Таким образом, поперечное сечение квадрупольной ионной ловушки напоминает вход в линейный квадрупольный масс-анализатор (рис. 2Б). Однако угол между асимптотами, охватывающими кольцевой электрод, равен 70,5° вместо 90°. К концевым электродам и кольцевому электроду прикладывается потенциал постоянного тока и радиочастотный потенциал соответственно. Таким образом, внутри квадрупольной ионной ловушки создается трехмерное радиочастотное квадрупольное поле для удерживания ионов в строго определенном объеме. Принцип работы квадрупольной ионной ловушки основан на том, чтобы создать такое радиочастотное квадрупольное поле, при котором ионы с заданным m/z или заданным диапазоном m/z приобретали стабильные траектории. В это же время «нежелательные» ионы, приобретая нестабильные траектории, удаляются из ловушки в аксиальном направлении. Вначале все ионы, имеющие m/z , представляющие интерес для исследователя, удерживаются в ловушке (ионы могут быть получены как внутри, так и вне ловушки). Затем прикладывается возрастающее радио-

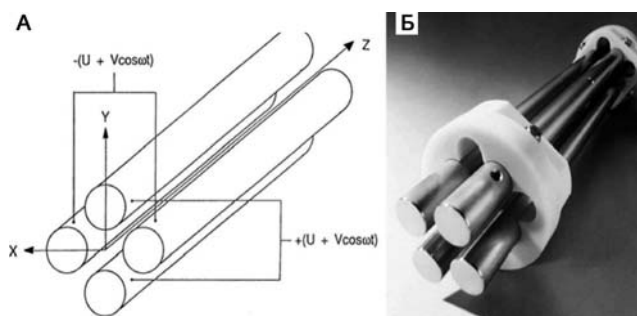


Рис. 2. Схема (А) и фотография (Б) линейного квадрупольного масс-анализатора [6].

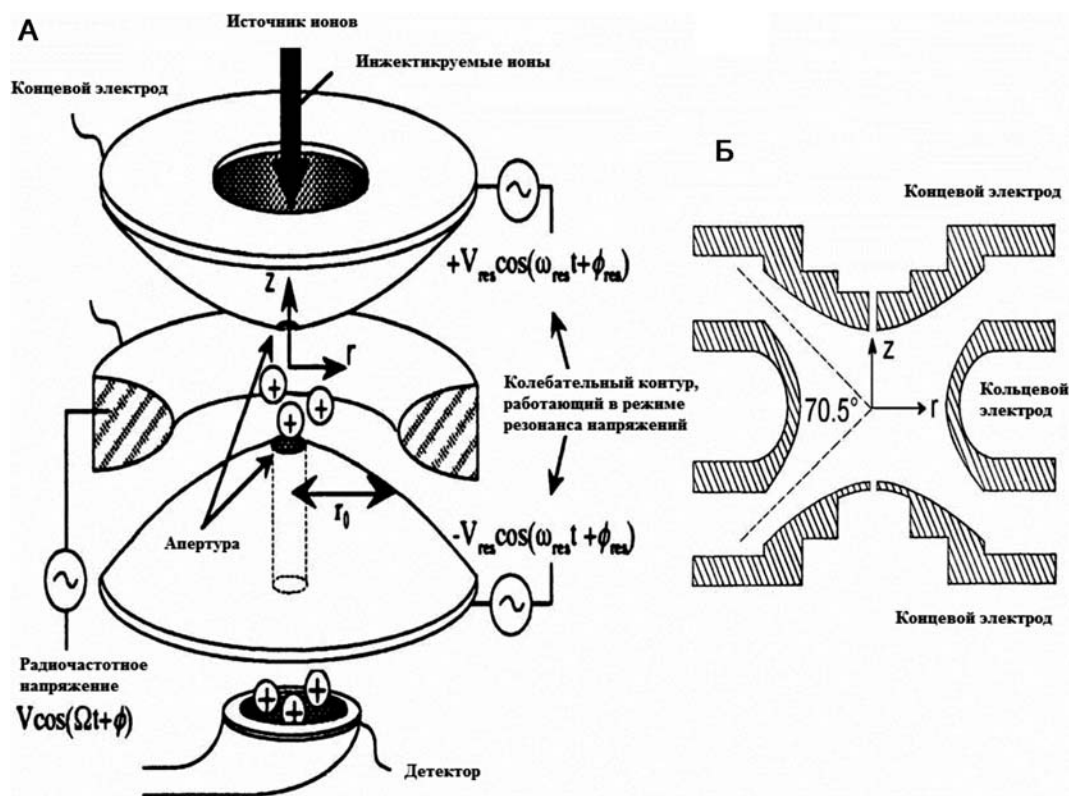


Рис. 3. Схема квадрупольной ионной ловушки: А — квадрупольная ловушка с внешним источником ионов; Б — поперечное сечение квадрупольной ионной ловушки.

частотное напряжение к кольцевому электроду (концевые электроды в это время заземлены), вызывая последовательное удаление ионов в порядке увеличения их m/z через отверстие в одном из концевых электродов. За этим отверстием находится электронный умножитель, где ионы детектируются [13].

Дополнительно к эффективному способу сканирования масс-спектрометры с квадрупольной ионной ловушкой позволяют проводить эксперименты методом тандемной масс-спектрометрии. Вместе с селективным удалением ионов из ловушки возможно удерживание интересующего исследователя иона-предшественника (родительский ион), его резонансное возбуждение и диссоциация, индуцированная соударениями, в той же ловушке. Это необходимо для получения фрагментных ионов предварительно изолированного иона. В результате получают масс-спектры, сравнимые с масс-спектрами, получаемыми с использованием тройных квадрупольных масс-анализаторов. Более того, полученные фрагментные ионы в ходе данных экспериментов, могут в дальнейшем быть изолированы и инициирована их последующая фрагментация. Подобные эксперименты могут быть очень полезными при необходимости установления структуры определяемых веществ. Кроме того, метод тан-

демной масс-спектрометрии с использованием квадрупольной ионной ловушки применим для детектирования ультрамалых количеств определяемых веществ. Это возможно благодаря высокой селективности и чувствительности метода (несколько нанограм в миллилитре мочи). Тем не менее, квадрупольная ионная ловушка имеет существенный недостаток, связанный с эффектом «пространственного заряда».

В качестве альтернативы трехмерной ловушке Пауля были предложены линейные (двумерные) ионные ловушки, которые демонстрируют очень высокую чувствительность [10]. Основные компоненты масс-анализатора с линейной ионной ловушкой идентичны обычному квадрупольному масс-анализатору, за исключением линз, находящихся на каждом конце электродов (рис. 4). Траектория движения ионов в радиальном направлении определяется квадрупольным полем, а удерживание их в аксиальном направлении обеспечивается электрическим полем на входе и выходе из масс-анализатора. Таким образом, ионы могут удерживаться несколько сот миллисекунд в ионной ловушке.

Масс-селективный выброс ионов возможен как в аксиальном, так и в радиальном направлении. Это большое преимущество линейных квадрупольных

ионных ловушек над трехмерными ловушками Пауля, когда речь идет о создании гибридных масс-спектрометров. Кроме того, благодаря высокой емкости, эффект «пространственного заряда» у линейных ионных ловушек наблюдается реже, чем у ловушек Пауля. Безусловно, это также сказывается и на чувствительности линейных ионных ловушек. Она выше, чем у ловушек Пауля.

В последнее время линейная ионная ловушка все чаще используется как внешний «концентратор ионов» в гибридных масс-спектрометрах (линейная ионная ловушка — времяпролетный масс-спектрометр, линейная ловушка — ионно-циклотронный резонанс, линейная ионная ловушка — квадрупольный масс-спектрометр, линейная ионная ловушка — орбитальная ионная ловушка). Замена третьего квадрупольной линейной ионной ловушкой приводит к увеличению чувствительности масс-спектрометра. В современных линейных ионных ловушках осуществимо аксиальное и радиальное возбуждение ионов, а также проведение МС/МС экспериментов.

Тройной квадрупольный масс-спектрометр

Первый коммерчески доступный тройной квадрупольный масс-спектрометр появился в 1978 г. [20]. Сегодня тройной квадрупольный масс-спектрометр стал золотым стандартом в аналитических лабораториях, применяющих масс-спектрометрические методы (рис. 5). Это особо ощутимо, когда речь идет о проведении количественных анализов.

Тройной квадрупольный масс-спектрометр идеально подходит для проведения МС/МС экспериментов. Первый квадруполь Q1 обладает всеми возможностями квадрупольного масс-анализатора, второй квадруполь служит камерой соударений для проведения экспериментов с диссоциацией, индуцированной соударениями (ДИС). Третий квадруполь, как и первый, обладает всеми функциями квадрупольного масс-анализатора. Очень часто, при использовании тройных квадрупольных масс-спектрометров, отдельно выбранные ионы направляют из Q1 в Q2, где происходят их диссоциация, индуцированная соударениями с атомами азота или аргона (давление в камере соударений составляет обычно 0,1—0,3 Па). Тщательная оптимизация всех параметров масс-анализатора позволяет значительно повысить эффективность ДИС. Когда нет необходимости в проведении МС/МС экспериментов, квадруполь Q1 или Q3 могут работать в режиме полного сканирования. В этом случае один из квадруполей выполняет функцию «фокусирующей линзы», т.е. прибор превращается в обычный квадрупольный масс-спектрометр. На первый взгляд, не имеет значения, какой квадруполь (Q1 или Q3) будет работать в режиме полного сканирования. Однако при примене-

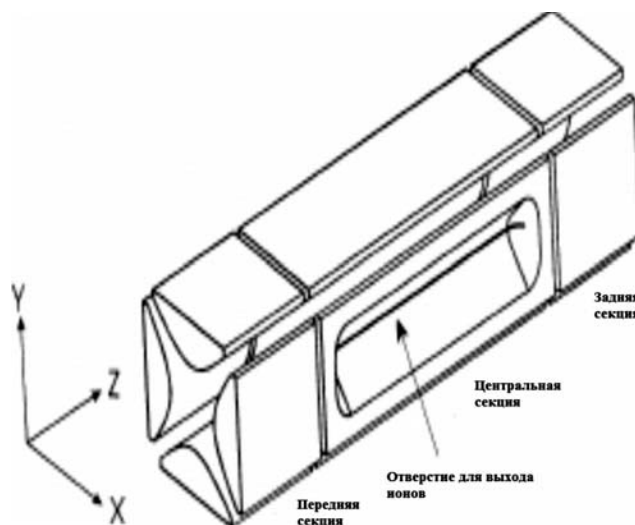


Рис. 4. Схема линейной ионной ловушки [10].

нии электронной ионизации работа квадруполь Q3 в режиме полного сканирования предпочтительна. Другими словами, в этом случае размеры источника ионов условно увеличиваются до входа в квадруполь Q3. Это приводит к тому, что фрагментные ионы образуются в большом количестве из-за роста числа столкновений. При использовании «мягких» способов ионизации этот эффект не наблюдается. В масс-спектрометрах с тройными квадрупольными масс-анализаторами квадруполь Q1 и Q3 могут работать независимо друг от друга. Это позволяет осуществлять МС/МС эксперименты, присущи только масс-спектрометрам с тройными квадрупольными. Возможные МС/МС эксперименты с применением масс-спектрометров с тройными квадрупольными приведены в таблице. Возможные режимы сканирования демонстрируют большую гибкость, так необходимую при многокомпонентном детектировании ксе-

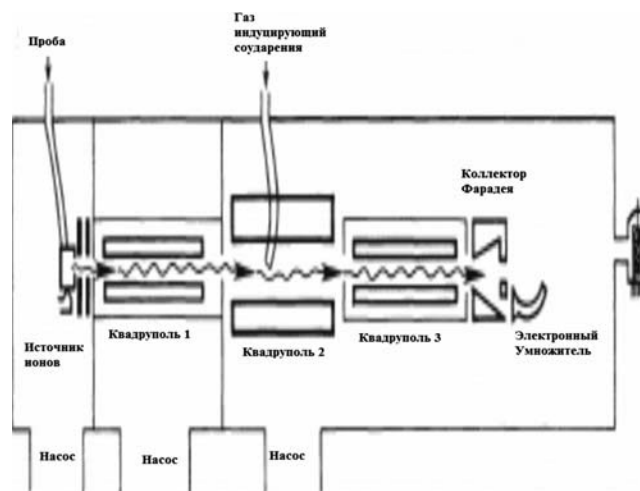


Рис. 5. Схема тройного квадрупольного масс-спектрометра [20].

Режимы сканирования масс-спектрометров с тройными квадруполями

Детектируемые ионы	Функции Q1	Функции Q2	Функции Q3
Детектируются продукты диссоциации ионов с m/z $m1$	Не сканирует, функционирует как масс-фильтр, пропуская только ион с m/z $m1$	В Q2 происходит диссоциация, индуцированная соударениями во всех трех случаях	Сканирует все m/z от $m0$ до $m1$ с единичным разрешением
Детектируется только один (в идеале) продукт диссоциации ионов с любой m/z , принадлежащему заданному диапазону	Сканирует все m/z от $m2$ до интересующего исследователя $m3$ с единичным разрешением		Не сканирует, функционирует как масс-фильтр, пропуская только ионы с m/z $m2$
Детектирует нейтральную потерю, равную δm	Сканирует желаемый диапазон m/z		Сканирует желаемый диапазон m/z со сдвигом δm в сторону низких m/z

нобиотиков и количественном анализе. Эти возможности также используются в метаболомике и протеомике.

В настоящее время применение ВЭЖХ-МС в биоаналитических исследованиях в основном ориентировано на использование ВЭЖХ-МС/МС систем. В этом случае определяют известные вещества или их метаболиты, детектируя характеристичный продукт ДИС иона, принадлежащего определяемому веществу. Таким образом, достигается рекордная чувствительность. Однако данный подход имеет существенное ограничение, связанное с числом детектируемых веществ (оно лимитировано несколькими десятками соединений).

Магнитный секторный масс-анализатор с двойной фокусировкой

Разработанный в 1934 г. Герцогом [14] секторный масс-спектрометр первым «проторил» дорогу к аналитической химии. Развитие этого масс-анализатора не прекратилось до и после второй мировой войны. Были разработаны самые различные комбинации и геометрии этого масс-спектрометра. Интенсивное внедрение этих масс-спектрометров в масс-спектрометрические лаборатории продолжалось до 50-х годов прошлого века. С этого времени они становятся все более доступными. Первые масс-спектрометры были очень сложные в обслуживании приборы. Однако с каждым

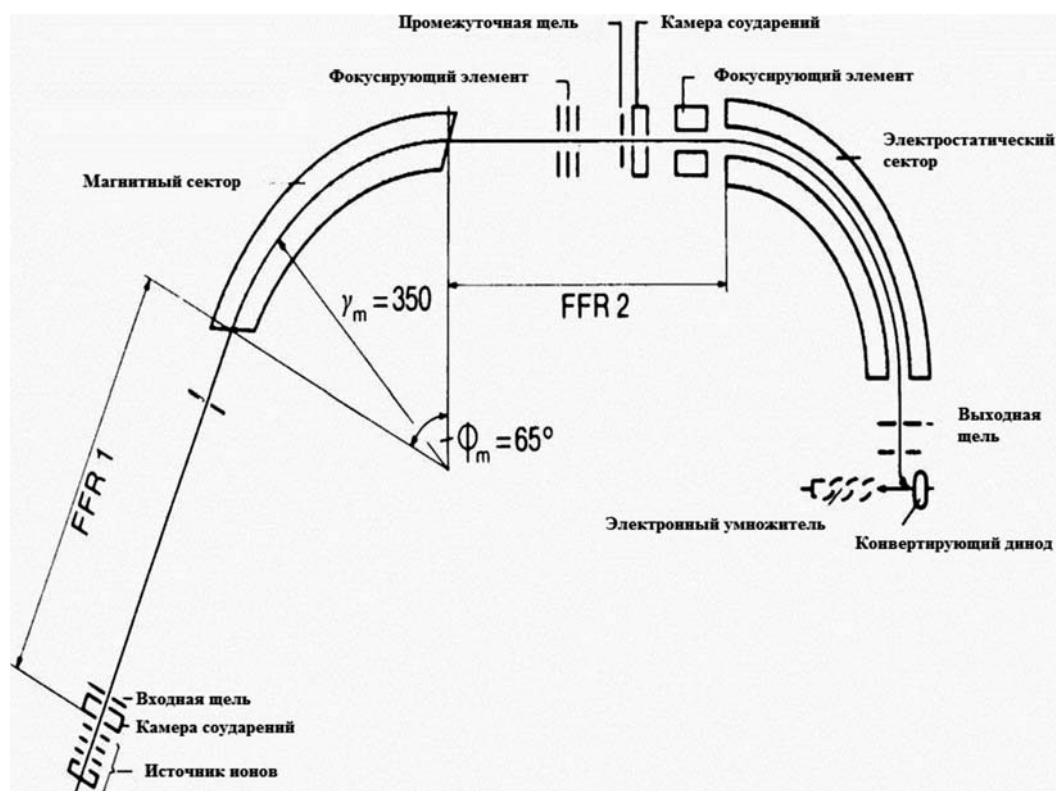


Рис. 6. Схема масс-спектрометра с двойной фокусировкой [14].

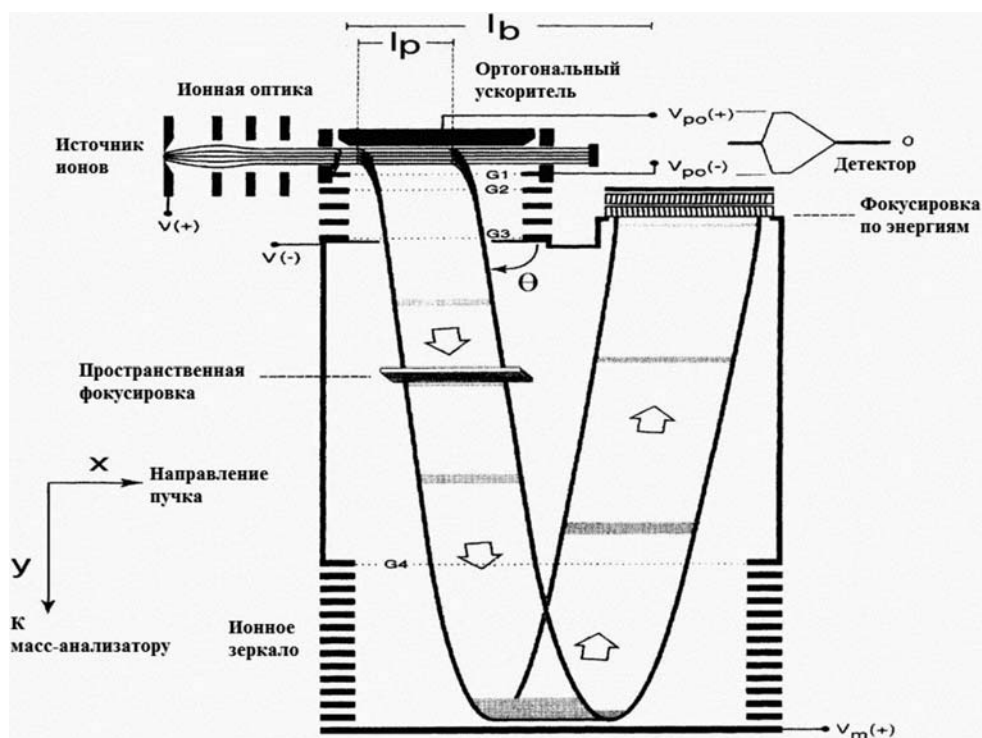


Рис. 7. Схема времяпролетного масс-спектрометра с ортогональным вводом [8].

годом повышалась их разрешающая способность. Первые приборы использовали магнитный сектор (символ Б). Позже появились масс-спектрометры с двойной фокусировкой, имеющие дополнительно электростатический сектор (символ Е), который сейчас является стандартным для таких масс-спектрометров. Современные магнитные секторные масс-спектрометры с двойной фокусировкой позволяют определять m/z с чрезвычайно высокой точностью (несколько миллионов долей) и детектировать ионы с высоким разрешением. В настоящее время они нередко встречаются в аналитической практике.

К слову, в допинговом контроле масс-спектрометры с двойной фокусировкой стали использовать с 1994 г. (Finnigan MAT 95). Их дебют состоялся на летних Олимпийских играх в Лос-Анджелесе. В упомянутых масс-спектрометрах реализована геометрия (ВЕ). Использование магнитного сектора в этих масс-спектрометрах позволяет разделять и фокусировать ионы в зависимости от их отношения импульса (он включает массу) к заряду. В то же время электрический сектор, работая вне зависимости от массы ионов, отклоняет их в зависимости от их кинетической энергии (рис. 6). Другими словами, такая конфигурация позволяет ионам, обладающим разной энергией (но одинаковой массой), достичь детектора одновременно. Двойная фокусировка пучка ионов (изначально они имеют общую массу, но разную кинетическую

энергию), реализованная в одном масс-спектрометре, позволяет достичь очень высокого разрешения (до 100 000). Вследствие этого сфокусированные пучки ионов могут проходить через узкие металлические щели практически без потери суммарного отклика [15]. Однако высокая стоимость и громоздкость масс-спектрометров с двойной фокусировкой является серьезным препятствием к их широкому распространению в аналитических лабораториях.

Времяпролетный масс-анализатор

Возможность использовать корреляцию между массой ионов и их временем пролета через дрейфовую трубу определенной длины для расчета m/z (диапазон масс теоретически неограничен) была показана в 1946 г. Стефенсоном. Первый времяпролетный масс-спектрометр для аналитических целей был разработан в 1955 г. МакЛареном. Однако активный интерес исследователей к этому масс-спектрометру вернулся только в конце 80-х годов с революционным прогрессом в электронике и программном обеспечении [9]. Развитию времяпролетной масс-спектрометрии также способствовали импульсные методы ионизации, которые идеально ей подходят. Безусловно, разработка матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) стала отправной точкой широкого применения времяпролетных масс-спектрометров аналитиками. «Новые» приложе-

ния времяпролетной масс-спектрометрии относились чаще всего к природным и синтетическим полимерам [8]. Физические основы работы первых времяпролетных масс-спектрометров чрезвычайно просты. После ионизации молекул, образовавшимся ионам передается импульс, благодаря которому они получают ускорение и поступают во времяпролетную трубу (в ней отсутствует электрическое поле). Таким образом, «легкие» ионы пролетают трубу быстрее чем «тяжелые». Точное измерение времени пролета позволяет рассчитать m/z . Для самых первых времяпролетных масс-спектрометров было характерно низкое разрешение (меньше 1000) из-за отсутствия дополнительной фокусировки ионного пучка. В 1969 г. для повышения разрешения Мамыриным было предложено ионное зеркало, так называемый рефлектрон, представляющий собой серию кольцевых электродов [12]. Безусловно импульсный характер работы времяпролетного масс-анализатора осложняет его сочетание с непрерывными методами ионизации. Для решения этой проблемы Додоновым было предложено ортогонально «расчленить» ионный пучок, выходящий из источника с ионизацией электрораспылением [7]. Масс-спектрометры, в которых реализован данный подход называют времяпролетными масс-спектрометрами с ортогональным вводом. После ортогонального ускорения непрерывного ионного пучка анализируется заданный пакет ионов с высоким разрешением (больше 20 000 в современных приборах) и с высокой точностью масс (около 10 млн^{-1}) (рис. 7). Основным достоинством времяпролетных масс-спектрометров с ортогональным вводом — это высокая чувствительность в режиме полного сканирования. Для выполнения МС-МС экспериментов создаются гибридные системы квадруполь-квадруполь-времяпролетный масс-анализатор [5]. Препятствием для широкого применения в аналитических лабораториях является только их стоимость.

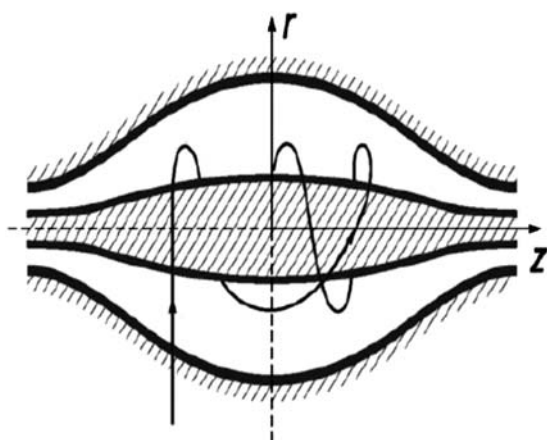


Рис. 8. Схема ячейки орбитальной ионной ловушки [11].

Орбитальная ионная ловушка

Орбитальная ионная ловушка была разработана в 1999 г. Коммерчески доступной она стала в сочетании с линейной ионной ловушкой в 2005 г. Однако она быстро завоевала популярность в метаболомных исследованиях благодаря рекордному разрешению (от 100 000 до 200 000 в зависимости от конфигурации) [18].

Сердцем системы является аксиально-симметричный масс-анализатор. Он состоит из «веретенообразного» центрального электрода, окруженного парой внешних «колоколообразных» электродов (рис. 8). Принцип его работы основан на создании потенциального барьера, останавливающего ионы до того, как они достигнут центрального электрода. В результате, попадая в орбитальную ионную ловушку, ионы оказываются в статическом электрическом поле. Как показано на рис. 8, стабильные траектории ионов в орбитальной ионной ловушке представляют собой сочетание вращения ионов вокруг центрального аксиального электрода и гармонических осцилляций вдоль него. Частота w этих гармоник для осцилляций вдоль оси z зависит только от отношения массы к заряду m/q и искривления поля k :

$$w = \sqrt{\frac{q}{m}} \times k.$$

Регистрируется наведенный ток, полученный от осциллирующих ионов. Его частота равна частоте движения ионов, а амплитуда пропорциональна количеству ионов в орбитальной ионной ловушке. Прибегая к быстрому преобразованию Фурье наведенного тока получают частоты этих аксиальных осцилляций [11].

В последнее время аналитики изучают потенциал орбитальной ионной ловушки при обнаружении β_2 -агонистов, веществ с антиэстрогенной активностью и других ксенобиотиков в биологических жидкостях [19].

Два года назад никто не предполагал, что протеомная масс-спектрометрия, использующая самые передовые и современные масс-анализаторы, будет активно применяться в клинической практике. Шесть лет назад они применялись только в самых «продвинутых» научно-исследовательских институтах. Сегодня сотни американских больниц оснащаются орбитальными ионными ловушками. Резко сокращается время между разработкой метода и его практического применения. На смену гонке идей и концепций пришла гонка активного внедрения. Говоря об инновации, мы должны помнить, что по определению это прежде всего активное приложение новых знаний в решении современных проблем страны и общества. Поэтому мы вправе считать масс-спектрометрию инновационным методом и причислить ей великое будущее.

Список литературы

1. **Иванов А.В., Кудан П.В., Лузянин Б.П., Кубати-ев А.А.** Определение основных низкомолекулярных ами-нотиолов в плазме крови методом ВЭЖХ-МС // Пато-генез. — 2012. — Т. 10, №2. — С. 68–71.
2. **Иванов А.В., Лузянин Б.П., Кубатиев А.А.** Исполь-зование этилмалеимида для масс-спектрометрического детектирования фракций гомоцистеина в плазме крови. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2011. — 9. — С. 256–259.
3. **Иванов А.В., Лузянин Б.П., Московцев А.А., Ротки-на А.С., Кубатиев А.А.** Определение содержания гомо-цистеина в плазме крови методом капиллярного электр-офореза с масс-спектрометрическим детектированием // Журнал аналитической химии. — 2011. — Т. 66. — С. 324–328.
4. **Иванов А.В., Московцев А.А., Лузянин Б.П., Ротки-на А.С., Кубатиев А.А.** Определение восстановленной фракции гомоцистеина в плазме крови с помощью ВЭЖХ-МС // Патологическая физиология и экспери-ментальная терапия. — 2011. — №2. — С. 55–60.
5. **Coles J., Guilhaus M.** Orthogonal acceleration — a new direction for TOFMS: fast sensitive mass analysis for continuous ion sources // Trends Anal. Chem. — 1993. — 12. — P. 203–213.
6. **Dawson P.H.** Quadrupole mass spectrometry and its applications. 1st ed. — Elsevier: New York, 1976.
7. **Dodonov A.F., Kozlovski V.A., Soulimenkov I.V., Raz-nikov V.V., Loboda A.V., Zhen Z., Horvath T., Wollnik H.** High-resolution electrospray ionization orthogonal-injection time-of-flight mass spectrometer // Eur. J. Mass Spectrom. — 2000. — 6. — P. 481–490.
8. **Guilhaus M.** Principles and instrumentation in TOF-MS. Physical and instrumental concepts // J. Mass Spectrom. — 1995. — 30. — P. 1519–1532.
9. **Guilhaus M.** The return of time-of-flight to analytical mass spectrometry // Adv. Mass Spectrom. — 1995. — 13. — P. 213–226.
10. **Hager J.W.** A new linear ion trap mass spectrometer // Rapid Commun. Mass Spectrom. — 2002. — 16. — P. 512–526.
11. **Makarov A.** Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis // Anal. Chem. — 2000. — 72. — P. 1156–1162.
12. **Mamyrin B.A.** Time-of-flight mass spectrometry (concepts, achievements, and prospects) // Int. Jour. of Mass Spectr. — 2001. — 206, 3. — P. 251–266.
13. **March R.E., Hughes R.J.** Quadrupole storage mass spectrometry. — John Wiley & Sons: Chichester, 1989.
14. **Mattauch J., Herzog R.** Uber Einen Neuen Massens-pektrographen // Z. Phys. — 1934. — 89. — P. 786–795.
15. **Morrison J.D.** Ion focusing, mass analysis, and detec- tion, in Gaseous ion chemistry and mass spectrometry / Fut-rell J.H., Ed. — New York: John Wiley & Sons, 1986. — P. 107–125.
16. **Paul W.** Electromagnetic traps for charged and neut- ral particles, in Nobel Prize Lectures in Physics 1981–1990. — World Scientific Publishing: Singapore, 1993. — P. 601–622.
17. **Paul W., Steinwedel H.** A new mass spectrometer with- out magnetic field // Z. Naturforsch. — 1953. — 8A. — P. 448–450.
18. **Schanzer W., Geyer H., Fuscholler G., Halatche- va N., Kohler M., Parr M., Guddat S., Thomas A., Thevis M.** Mass spectrometric identification and characterization of a new long-term metabolite of metandienone in human urine // Rapid Commun. Mass Spectrom. — 2006. — 20. — P. 2252–2258.
19. **Virus E.D., Sobolevsky T.G., Rodchenkov G.M.** Intro- duction of HPLC/Orbitrap mass spectrometry as screening method for doping control // J. Mass Spectrom. — 2008. — 43. — P. 949–957.
20. **Yost R.A., Enke C.G.** Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer // J. Am. Chem. Soc. — 1978. — 100. — P. 2274–2275.

Поступила 12.09.13

Сведения об авторах:

Иванов Александр Владимирович, науч. сотр. лаб. функциональной протеомики и метаболомики ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Лузянин Борис Петрович, д-р хим. наук, проф., зав. лаб. функциональной протеомики и метаболомики ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Пальцын Александр Александрович, проф., зав. лаб. регуляции репаративных процессов ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Кубатиев Аслан Амирханович, д-р мед. наук, акад. РАМН, проф., дир. ФГБУ «НИИОПП» РАМН

В.А. Аладинский^{1,2}, Н.Г. Никифоров^{2,3}, В.А. Орехова^{2,3},
А.А. Мельниченко², В.П. Карагодин², И.А. Собенин^{2,4}, А.Н. Орехов^{2,4}

Прямая антиатеросклеротическая терапия: возможные подходы, результаты клинических исследований

¹ Московский Физико-технический институт (Государственный Университет),
141700, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9

² Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный Центр Сколково,
143025, Сколково, Московская область, Россия, ул. Новая, 100

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский кардиологический научно-производственный комплекс»
Минздрава России, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, 15

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»
Российской академии медицинских наук, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8

В работе рассмотрены основные подходы к замедлению прогрессирования и регрессии атеросклероза. Описаны липидная и нелипидная терапии атеросклероза. Проанализированы результаты клинических исследований влияния антиатеросклеротических препаратов. Основным показателем являлась толщина комплекса интима-медиа сонных артерий, измеренная методом ультрасонографии.

Ключевые слова: ангиотензин-конвертирующий фермент, антиатеросклеротическая терапия, атеросклероз, визуализация атеросклероза, кальциевые антагонисты, ЛВП-терапия, статины

V.A. Aladinsky^{1,2}, N.G. Nikiforov^{2,3}, V.A. Orekhova^{2,3},
A.A. Melnichenko², V.P. Karagodin², I.A. Sobenin^{2,4}, A.N. Orekhov^{2,4}

Direct antiatherosclerotic therapy: possible approaches, results of clinical trials

¹ Moscow Institute of Physics and Technology, 9, Institutskij per., Dolgoprudny, Moscow region, 141700, Russia

² Skolkovo Innovations Centre, Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Center, 143025, 100 Novaya Str., Moscow, Russia

³ Russian Cardiology Research Center, 15a, 3rd Cherepkovskaya str., Moscow, 121552, Russia

⁴ The Institute for General Pathology and Pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

The paper discusses the main approaches to slowing the progression and epy regression of atherosclerosis. Lipid and non-lipid treatment of atherosclerosis described. The results of clinical studies of the effect of antiatherosclerotic agents are analyzed. The main indicator is the thickness of the intima-media complex of the carotid arteries as measured by ultrasonography.

Key words: angiotensin-converting enzyme, antiatherosclerotic therapy, atherosclerosis, atherosclerosis imaging, calcium antagonists, HDL therapy, statins

Атеросклероз может оставаться бессимптомным в течение долгого времени. Сложно получить новое представление о процессе заболевания и невозможно оценить эффективность прямой антиатеросклеротической терапии без применения методов, определяющих ранние атеросклеротические изменения. Визуализированные испытания представляют единственный подход в разработке антиатеросклеротической терапии для тестирования эффективности препаратов.

Для корреспонденции: Никифоров Никита Геннадьевич, аспирант ФГБУ «РКНПЦ» Минздрава РФ.
E-mail: nikiforov.mipt@googlemail.com

Визуализация атеросклеротических изменений

Существуют многочисленные методы визуализации, используемые для оценки выраженности атеросклероза [59]. Традиционно преобладающей методикой, применяемой для оценки развития атеросклероза, являлась количественная коронарная ангиография. С помощью этого метода можно получить изображение поперечного разреза сосуда с контрастно выделенным просветом. Эта методика крайне важна в клинической практике, но с ее помощью нельзя получить полезную информацию на ранних стадиях утолщения артериальной стенки до образования атеросклеротической бляшки. Внутрисосудистое ультразвуковое исследование (ВСУЗИ) — инвазивный метод визуализации стенки

и просвета артерии, используемый для идентификации регрессии атеросклероза. Толщина слоя интима-медиа сонной артерии может быть измерена неинвазивно. Этот метод был опробован в гистологических и эпидемиологических исследованиях [67]. Магнитно-резонансная томография (МРТ) сонных артерий также позволяет неинвазивно визуализировать стенку и просвет сосуда без подвергания пациента радиации, хотя с меньшим разрешением изображения, чем при использовании ВСУЗИ. С помощью МРТ можно получить информацию о структуре атеросклеротического поражения. Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) позволяет оценить уровень поглощения ¹⁸F-фтордезоксиглюкозы клетками в стенке сосуда, используя компьютерную томографию. По поглощению ¹⁸F-фтордезоксиглюкозы можно судить о метаболической активности клеток и воспалении в артериальной стенке [2].

Толщина слоя интима-медиа сонной артерии

Атеросклероз поражает большую часть кровяного русла, и неинвазивная визуализация поверхностных артерий при помощи ультразвука рассматривается, как косвенный показатель развития атеросклероза во многих исследованиях. Экстракоронарные атеросклеротические бляшки могут быть быстро и безопасно определены в сонных и бедренных артериях, брюшной аорте. Экстракоронарное атеросклеротическое поражение коррелирует с большим числом стандартных факторов риска и, что важнее, с большим сердечным риском [54]. Атеросклероз сонной артерии наиболее коррелировал с коронарной болезнью сердца [15, 26, 27, 42]. Ультрасонография периферических артерий рассматривается как чувствительный метод обнаружения раннего атеросклероза и может быть полезна при оценке эффективности терапии. Толщина слоя интима-медиа (ТИМ) артериальной стенки — самое раннее анатомическое изменение в развитии атеросклероза, которое можно обнаружить. В-режим ультрасонографии с высоким разрешением широко используется для неинвазивной количественной оценки ТИМ сонной артерии в доклинических стадиях атеросклероза [17]. Предполагается, что ТИМ сонной артерии является маркером атеросклероза [5, 8, 12, 15, 27, 31, 44, 52]. Таким образом, ультразвуковое исследование ТИМ сонных артерий — достаточно информативный метод для наблюдения динамики развития атеросклероза в процессе длительного лечения.

Для сравнения эффективности различных антиатеросклеротических препаратов, выбрано исследование ТИМ сонных артерий методом ультрасонографии. Результаты исследований проанализированы ниже.

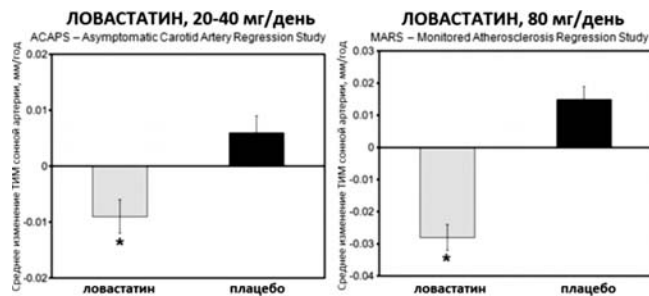


Рис. 1. Антиатеросклеротический эффект ловастатина.

Препараты, влияющие на метаболизм липопротеидов

Большинство исследований атеросклероза проводилось с препаратами, действующими на метаболизм липидов. Это объясняется тем, что единственной теорией, получившей клиническое подтверждение, является холестериновая гипотеза. Эта гипотеза была выдвинута Н.Н. Аничковым более ста лет назад. Изначально, гипотеза Аничкова обосновывалась высоким уровнем общего холестерина в крови. Современные теории содержат только некоторые аспекты этой гипотезы; в особенности, было показано, что атеросклероз связан не с общим уровнем холестерина, а с атерогенным холестерином ЛНП (липопротеиды низкой плотности) и антиатерогенным холестерином ЛВП (липопротеиды высокой плотности). Более того, обсуждается роль различных молекул, участвующих в метаболизме липопротеинов.

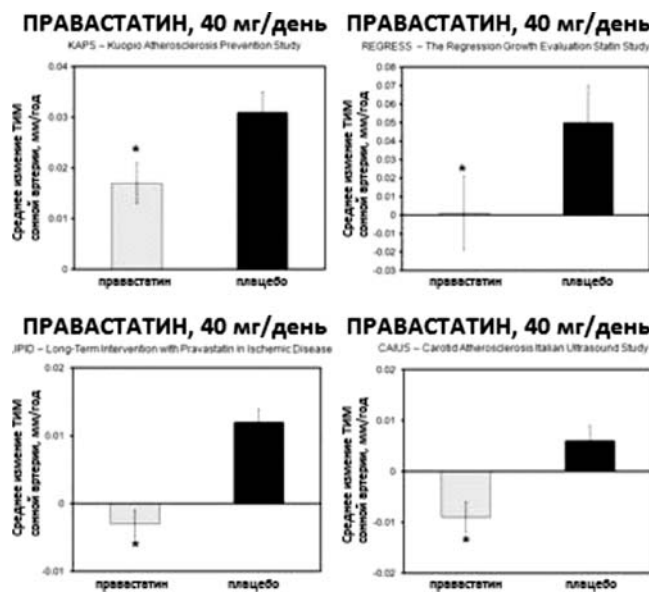


Рис. 2. Антиатеросклеротический эффект правастатина.

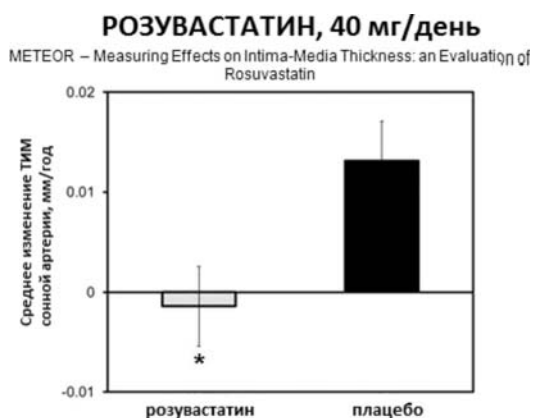


Рис. 3. Антиатеросклеротический эффект розувастатина.

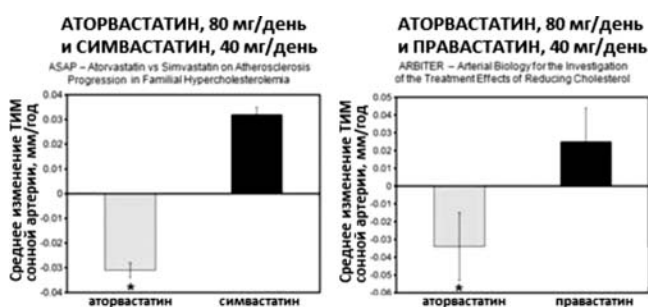


Рис. 4. Антиатеросклеротический эффект статинов.

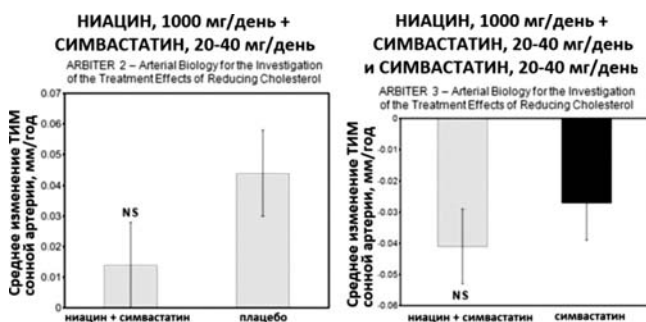


Рис. 5. Антиатеросклеротический эффект симвастатина в комбинации с ниацином.

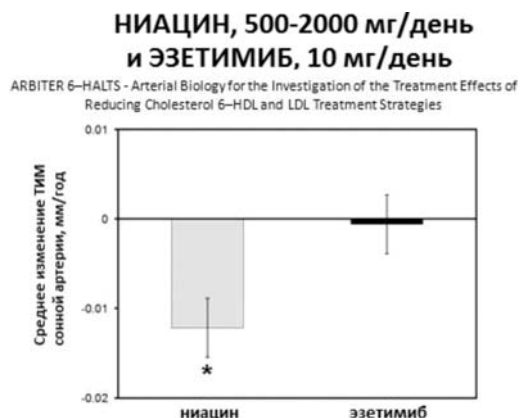


Рис. 6. Антиатеросклеротический эффект ниацина.

Статины были введены в клиническую практику, как препараты, снижающие синтез холестерина и уровень ЛНП. Необходимо отметить, что статины назначаются как липидопонижающие лекарства, но не антиатеросклеротические. В первых клинических исследованиях атеросклероза статины применялись как липидопонижающие агенты для проверки гипотезы, согласно которой, снижение уровня холестерина может вызвать регрессию атеросклероза. Хотя прямой корреляции с регрессией атеросклероза выявлено не было, эти исследования показали антиатеросклеротический эффект статинов. Позже, для объяснения нелипидных, антиатеросклеротических эффектов обсуждалась плеотропная активность статинов [4, 14, 20, 25, 29, 40, 58, 70].

Первым статином, который продемонстрировал антиатеросклеротический эффект, был ловастатин [50]. На рис. 1 показан антиатеросклеротический эффект ловастатина, полученный в двух исследованиях, ASCAP и MARS, с различными дозами ловастатина [38, 50]. Более высокая доза оказывает больший эффект (рис. 1).

Другой статин, правастатин, экстенсивно изучался в клинических испытаниях. Антигиперхолестеринемический эффект правастатина подобен эффекту ловастатина [41]. Однако антиатеросклеротический эффект отсутствовал при приеме доз 20—40 мг в день, как в исследовании PLACII [52], так и в KAPS, REGRESS, LIPID, CAIUS [3, 21, 53, 65]. На рис. 2 видно, что в двух исследованиях (KAPS, REGRESS) правастатин только замедлил развитие атеросклероза, но не способствовал регрессии, а в двух других исследованиях (LIPID, CAIUS) вызвал умеренную регрессию атеросклероза.

У одного из наиболее новых статинов, розувастатина, была выявлена антиатеросклеротическая активность [18]. Было показано, что розувастатин предотвращает прогрессирование атеросклероза (рис. 3).

Также проводились сравнительные исследования антиатеросклеротической эффективности и других статинов [56, 61]. Аторвастатин сравнивался с симвастатином и правастатином. На рис. 4 видно, что аторвастатин более эффективен.

Статины также применялись в комбинации с ЛВП-повышающим агентом, никотиновой кислотой [62, 63, 64]. Комбинация симвастатина с ниацином не индуцировала регрессию атеросклероза и не обладала статистически значимым антиатеросклеротическим эффектом по сравнению с плацебо (рис. 5). Такая комбинация не оказывала более значительного эффекта на регрессию атеросклероза, чем симвастатин отдельно (рис. 5). Другое исследование показало, что использование пролонгированного ниацина вызывает значительную регрессию утолщения интима-медиа сонной артерии при комбинировании со статином (симвастатином или аторвастатином), а также что ниацин эффективнее эзетимиба (рис. 6).

ЛВП-терапия

На данный момент общепризнанно, что разработка лекарственных препаратов, повышающих уровень ЛВП, вероятно, является положительной тенденцией в развитии лечения атеросклероза. Эта гипотеза связана с Фрамингемским исследованием сердца, в котором содержание ЛВП в плазме обратно коррелировало с развитием сердечнососудистых заболеваний, независимо от уровня ЛНП [28]. Повышение уровня циркулирующих ЛВП представляется перспективной терапевтической направленностью.

ЛВП-повышающая терапия может включать введение ЛВП, ЛВП-подобных частиц или апоА-1 схожих пептидов, так же как и лечение ингибиторами белка переноса холестерина эфира (СЕТР). Однако, клинические испытания с апоА-1 Milano/фосфолипид комплексами (ЕТС-206) [43], комплексом нативного апоА-1 и фосфатидилхолина (СЛ-111) [60], делипидированными ЛВП [68] не выявили статистически значимого антиатеросклеротического эффекта по сравнению с плацебо.

Другой подход к повышению уровня ЛВП холестерина — это ингибирование СЕТР. СЕТР осуществляет перенос эфиров холестерина от ЛВП к апоВ-содержащим ЛНП и ЛОНП (липопротеиды очень низкой плотности). Теоретическое обоснование ингибирования СЕТР основывается на том, что ЛВП холестерин в ЛВП фракциях не способен вызывать атеросклероз. С другой стороны, ЛНП доставляют холестерин во все ткани, включая стенки сосудов, и избыточный холестерин в ЛНП фракции является причинным фактором атеросклероза. До настоящего времени, все попытки показать антиатеросклеротический эффект ингибирования СЕТР оказались безуспешными, потому что все известные клинические исследования, связанные с ингибированием СЕТР, были по разным причинам преждевременно остановлены.

Нелипидная антиатеросклеротическая терапия

Кальциевые антагонисты

Одним из стимулов продолжать исследования влияния кальциевых антагонистов на развитие атеросклероза были данные, полученные на животных, о антиатеросклеротической эффективности кальциевых антагонистов [11, 69]. Однако первые испытания кальциевых антагонистов на людях не были успешными [9, 71]. У больных артериальной гипертензией ни исрадипин, ни верапамил не индуцировали регрессию атеросклероза; ни один из этих препаратов значительно не отличался от диуретиков, применяемых в качестве контрольных препаратов (рис. 7).

Единственное успешное исследование с нифедипином [55] продемонстрировало регрессию атеросклероза у больных артериальной гипертензией и значительное различие между лечением нифедипином и диуретиками, которые использовались как контрольный препарат (рис. 8).

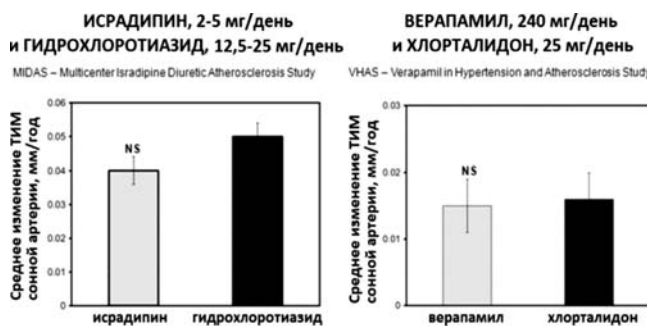


Рис. 7. Антиатеросклеротический эффект кальциевых антагонистов.

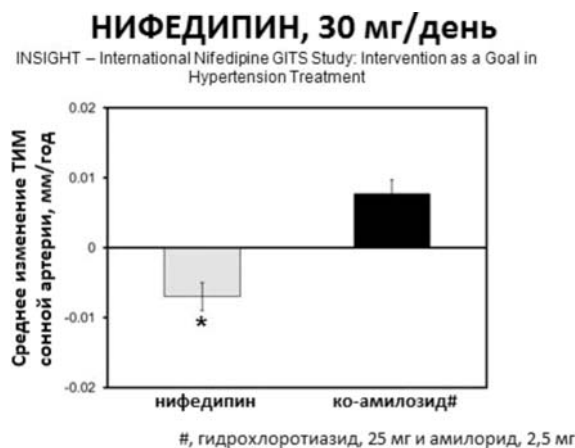


Рис. 8. Антиатеросклеротический эффект нифедипина.

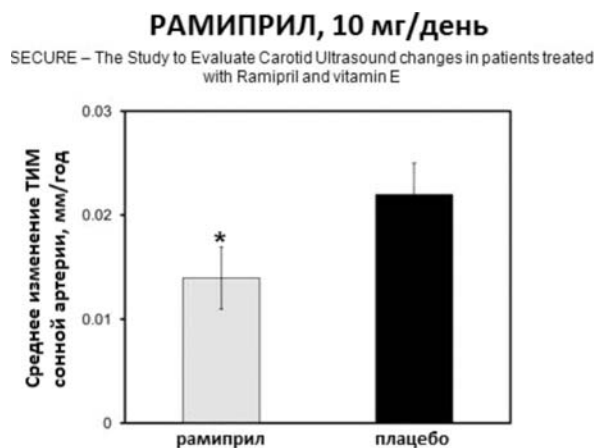


Рис. 9. Антиатеросклеротический эффект рамиприла.

*Ингибирование
ангиотензин-конвертирующего фермента*

Экспериментальные и эпидемиологические данные наводят на мысль, что активация ренин-ангиотензин-альдостерон системы играет важную роль в атерогенезе, а также может быть полезно длительное ингибирование ангиотензин-конвертирующего фермента [36]. В самом деле, длительное лечение рамиприлом (ингибитором ангиотензин-конвертирующего фермента) дало положительный результат в замедлении прогрессирования атеросклероза, по сравнению с плацебо (рис. 9) [37].

**Роль натуральных препаратов
в регрессии атеросклероза**

Развитие атеросклероза происходит в течение многих лет. Натуральные продукты могли бы стать альтернативой обычной медицине, не дающей должного результата при столь продолжительном лечении. Было показано, что накопление липидов сопровождается стимуляцией других проявлений атеросклероза на клеточном уровне, а именно синтезом внеклеточного матрикса и пролиферацией ГМК [46]. А значит, исследование эффекта экстракта чеснока на содержание внутриклеточных липидов связано с изучением механизмов антиатеросклеротических эффектов чеснока.

Алликор (чеснок)

Было проведено рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование «Мониторирование атеросклероза при снижении атерогенности» (МАСА) (ClinicalTrials.gov Identifier, NCT01734707). Целью данного исследования была оценка влияния Алликора на динамику изменения диффузного утолщения интима медиального слоя сонных артерий [45]. Прием препарата сопровождался снижением атерогенности сыворотки крови, низкий уровень которой в течение эксперимента поддерживался постоянным. У группы принимавшей алликор наблюдалась регрессия поражений и уменьшение толщины комплекса интима-медиа (ТИМ), в сравнение с плацебо-контролируемой группой. После 2-летней терапии наблюдалось значительное различие в сокращении ТИМ. При этом в группе плацебо средняя скорость увеличения ТИМ сонных артерий составила $0,015 \pm 0,008$ мм в год, при средней исходной ТИМ $0,931 \pm 0,009$ мм, а в основной группе изменения составили $-0,022 \pm 0,007$ мм в год, что существенно отличается от группы плацебо ($p=0,002$). Положительный эффект лечения Алликором был более выражен в течение первого года приема и составил $-0,028 \pm 0,008$ мм в первый год и $-0,016 \pm 0,007$ мм — во второй. Результаты данного эксперимента в основном совпадают с проведенным ранее исследованием Koscielny с соавторами [33]. После 4 лет лечения пре-

паратом Kwai (содержащем чеснок), рост атеросклеротических бляшек в сонных и бедренных артериях замедлился на 5—18%. В данном эксперименте было обнаружено, что размер атеромы при лечении чесноком уменьшился на 6—13% за 4 года. Однако в возрасте между 50 и 80 годами (когда наблюдался наибольший размер атеросклеротической бляшки) при терапии чесночным препаратом, размер бляшки оставался примерно постоянным [32]. Также уменьшение ТИМ, продемонстрированное в МАСА, сравнимо с наиболее успешными клиническими испытаниями других соединений [6, 7, 16, 30, 48, 53, 56, 70]. При этом в этих исследованиях использовались мощные липидснижающие агенты или антагонисты кальция, механизм действия которых связан со снижением уровня холестерина ЛНП, основным фактором риска для развития атеросклероза, а также гемодинамическим стрессом сосудистой стенки.

Прямое влияние чеснока на развитие атеросклероза обсуждалось в ряде работ [24, 33, 34, 49, 51]. Антиатеросклеротическое действие чеснока может быть обусловлено его способностью снижать уровень холестерина в крови [13, 51]. Этот эффект достигается путем ингибирования гидроксиметилглутарил-коэнзим-А-редуктазы (ГМК-КоА-редуктазы) [66].

Было также изучено *in vitro* антиатеросклеротическое и антиатерогенное действие алликора. Клетки были выделены из очага атеросклеротического поражения и из непораженной интимы аорты человека. В культуре нормальных клеток было инициировано проявление атеросклероза (добавлением в нее атерогенной сыворотки больных с ангиографически подтвержденным атеросклерозом). Чеснок способствовал снижению уровня триглицеридов, свободного и этерифицированного холестерина в клетках, выделенных из пораженной интимы, и предупреждал вызванное атерогенной сывороткой накопление липидов в клетках, выделенных из здоровой интимы. Результат исследования показал прямое антиатеросклеротическое и антиатерогенное действие алликора.

Инфламинат (календула, бузина, фиалка)

Атеросклероз обладает элементами антисептического воспаления, соответственно роль воспалительных цитокинов в развитии атеросклероза играет не последнюю роль [1, 19, 35]. А значит, лекарства, обладающие противовоспалительным эффектом, могут быть использованы в качестве профилактики атеросклероза. Инфламинат был изучен в пилотном клиническом исследовании по протоколу, применявшемся в описанном ранее исследовании МАСА (ClinicalTrials.gov Identifier, NCT01723404). При сравнении группы принимавшей инфламинат с плацебо-контролируемой, было показано, что инфламинат способствует регрессии атеросклероза [45].

Каринат (продукт, богатый фитоэстрогенами)

Заместительная гормональная терапия у женщин, в качестве профилактики атеросклероза после менопаузы дала негативные результаты в ряде исследований: WHI, PERI и HERS [10, 22, 23, 39, 47, 57]. Фитоэстрогены могли бы стать хорошей альтернативной заменой такому лечению. Проводился скрининг многих продуктов, богатых фитоэстрогенами. Большой антиатеросклеротический потенциал показали чеснок, экстракт виноградных косточек, листья зеленого чая и шишки хмеля. На основании данных продуктов была разработана биологически активная добавка «Каринат». Этот препарат продемонстрировал антиатерогенный эффект на клеточных моделях. Для оценки лечения Каринатом было проведено двойное слепое плацебо-контролируемое исследование с участием женщин в пери- и постменопаузальном периоде (ClinicalTrials.gov, NCT01741974 и NCT01742000). Основным параметром была скорость изменений ТИМ за год, а вторичным — динамика протекания климактерического синдрома, это параметр учитывался только у перименопаузальных женщин. В результате данных исследований выяснилось, что скорость развития атеросклероза у женщин в постменопаузальный период крайне высока: увеличение ИМТ составило 13% в год, а рост бляшек 40% в год. В группе принимавшей Каринат средняя ТИМ не изменилась (статистически незначимое увеличение на 6 мкм в год, т.е. менее 1%). Тем не менее, было зафиксировано торможение роста бляшек (27% за год).

Использование фитоэстрогенного комплекса женщинами в период менопаузы полностью подавляет образование новых атеросклеротических поражений, а также в 1,5 раза замедляет развитие существующих бляшек [45].

Заключение

Таким образом, существуют теоретически и экспериментально обоснованные подходы к регрессии и предотвращению атеросклероза. Опираясь на результаты клинических испытаний, можно сделать вывод о возможности регрессии атеросклероза при использовании антиатеросклеротических препаратов. Показано, что статины — ловастатин, правастатин, розувастатин, аторвастатин — проявляют антиатеросклеротическую активность. Кальциевый антагонист нифедипин вызывает регрессию атеросклероза. Применение ингибитора ангиотензин-конвертирующего фермента рамиприла приводит к замедлению прогрессирования атеросклероза. Рассмотрены антиатеросклеротический и антиатерогенный эффекты препаратов, основанных на экстрактах натуральных продуктов.

Список литературы

1. *Aidinian G., Weiswasser J.M., Arora S., Abularrahe C.J., Singh N., Sidawy A.N.* Carotid plaque morphologic characteristics // *Perspect. Vasc. Surg. Endovasc. Ther.* — 2006. — 18(1). — P. 63–70.
2. *Arsenault B.J., Kritikou E.A., Tardif J.C.* Regression of atherosclerosis // *Curr. Cardiol. Rep.* — 2012. — Aug. — 14(4). — P. 443–449.
3. *Baldassarre D., Veglia F., Gobbi C.* et al. Intima-media thickness after pravastatin stabilizes also in patients with moderate to no reduction in LDL-cholesterol levels: the carotid atherosclerosis Italian ultrasound study // *Atherosclerosis.* — 2000. — Aug. — 151 (2). — P. 575–583.
4. *Bellosta S., Bernini F., Ferri N.* et al. Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors // *Atherosclerosis.* — 1998. — Apr. — 137. — Suppl. — S101-9.
5. *Blankenhorn D.H., Hodis H.N.* George Lyman Duff Memorial Lecture. Arterial imaging and atherosclerosis reversal // *Arterioscler. Thromb.* — 1994. — 14. — P. 177–192.
6. *Blankenhorn D.H., Selzer R.H., Crawford D.W.* et al. Beneficial effects of colestipol-niacin therapy on the common carotid artery. Two- and four-year reduction of intima-media thickness measured by ultrasound // *Circulation.* — 1993a. — 88(11). — P. 20–28.
7. *Blankenhorn D.H., Azen S.P., Krams D.M.* et al. MARS Research Group. Coronary angiographic changes with lovastatin therapy. The Monitored Atherosclerosis Regression Study (MARS) // *Ann. Intern. Med.* — 1993b. — 119(10). — P. 969–976.
8. *Bots M.L., Hoes A.W., Koudstaal P.J.* et al. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: The Rotterdam Study // *Circulation.* — 1997. — 96. — P. 1432–1437.
9. *Borhani N.O., Mercuri M., Borhani P.A.* et al. Final outcome results of the Multicenter Isradipine Diuretic Atherosclerosis Study (MIDAS). A randomized controlled trial // *JAMA.* — 1996. — Sep. 11. — 276(10). — P. 785–791.
10. *Burger H.G., MacLennan A.H., Huang K.E., Castelo-Branco C.* Evidence-based assessment of the impact of the WHI on women's health // *Climacteric.* — 2012. — 15(3). — P. 281–287.
11. *Catapano A.L.* Calcium antagonists and atherosclerosis // *Experimental evidence* // *Eur. Heart J.* — 1997. — Jan. 18. — Suppl. A. — A80-6.
12. *Chambless L.E., Heiss G., Folsom A.R.* et al. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987–1993 // *Am. J. Epidemiol.* — 1997. — 146. — P. 483–494.
13. *Chen Z.Y., Jiao R., Ma K.Y.* Cholesterol-lowering nutraceuticals and functional foods // *J. Agric Food Chem.* — 2008. — 56(19). — P. 8761–8773.
14. *Comparato C., Altana C., Bellosta S.* et al. Clinically relevant pleiotropic effects of statins: drug properties or effects of profound cholesterol reduction? // *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* — 2001. — Oct. — 11(5). — P. 328–343.
15. *Craven T.E., Ryu J.E., Espeland M.A.* et al. Evaluation of the associations between carotid artery atherosclerosis and coronary artery stenosis. A case-control study // *Circulation.* — 1990. — 82. — P. 1230–1242.
16. *Crouse J.R. 3rd, Byington R.P., Bond M.G.* et al. Pravastatin, Lipids, and Atherosclerosis in the Carotid Arteries (PLAC-??) // *Am. J. Cardiol.* — 1995. — 75(7). — P. 455–459.
17. *Crouse J.R. 3rd, Craven T.E., Hagaman A.P., Bond M.G.* Association of coronary disease with segment-specific intimal-medial thickening of the extracranial carotid artery // *Circulation.* — 1995. — 92. — P. 1141–1147.

18. **Crouse J.R. 3rd, Raichlen J.S., Riley W.A.** et al. METEOR Study Group. Effect of rosuvastatin on progression of carotid intima-media thickness in low-risk individuals with subclinical atherosclerosis: the METEOR Trial // *JAMA*. — 2007. — Mar. 28. — 297 (12). — P. 1344–1353.
19. **Daugherty A., Webb N.R., Rateri D.L., King V.L.** Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokine regulation of macrophage functions in atherogenesis // *J. Lipid Res.* — 2005. — 46(9). — P. 1812–1822.
20. **Davignon J.** Methods and endpoint issues in clinical development of lipid-acting agents with pleiotropic effects // *Am. J. Cardiol.* — 1998. — Apr. 23. — 81(8A). — 17F–24F.
21. **De Groot E., Jukema J.W., Montauban van Swijndregt A.D.** et al. B-mode ultrasound assessment of pravastatin treatment effect on carotid and femoral artery walls and its correlations with coronary arteriographic findings: a report of the Regression Growth Evaluation Statin Study (REGRESS) // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 1998. — Jun. — 31 (7). — P. 1561–1567.
22. **De Villiers T.J., Stevenson J.C.** The WHI: the effect of hormone replacement therapy on fracture prevention // *Climacteric*. — 2012. — 15(3). — P. 263–266.
23. **Ellis M.J., Suman V.J., Hoog J.** et al. Randomized phase 3 neoadjuvant comparison between letrozole, anastrozole, and exemestane for postmenopausal women with estrogen receptor-rich stage 2 to 3 breast cancer: clinical and biomarker outcomes and predictive value of the baseline PAM50-based intrinsic subtype — ACOSOG Z1031 // *J. Clin. Oncol.* — 2011. — 29(17). — P. 2342–2349.
24. **El-Sayyad H.I., Abou-El-Naga A.M., Gadallah A.A., Bakr I.H.** Protective effects of *Allium sativum* against defects of hypercholesterolemia on pregnant rats and their offspring // *Int. J. Clin. Exp. Med.* — 2010. — 3(2). — P. 152–163.
25. **Farmer J.A.** Pleiotropic effects of statins // *Curr. Atheroscler. Rep.* — 2000. — May. — 2(3). — P. 208–217.
26. **Geroulakos G., O’Gorman D.J., Kalodiki E.** et al. The carotid intima-media thickness as a marker of the presence of severe symptomatic coronary artery disease // *Eur. Heart J.* — 1994. — 15. — P. 781–785.
27. **Geroulakos G., O’Gorman D., Nicolaidis A.** et al. Carotid intima-media thickness: correlation with the British Regional Heart Study risk score // *J. Intern. Med.* — 1994. — 235. — P. 431–433.
28. **Gordon T., Castelli W.P., Hjortland M.C.** et al. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study // *Am. J. Med.* — 1977. — May. — 62(5). — P. 707–714.
29. **Gotto Jr A.M. Jr, Farmer J.A.** Pleiotropic effects of statins: do they matter? // *Curr. Opin. Lipidol.* — 2001. — Aug. — 12(4). — P. 391–394.
30. **Hodis H.N.** Reversibility of atherosclerosis — evolving perspectives from two arterial imaging clinical trials: the cholesterol lowering atherosclerosis regression study and the monitored atherosclerosis regression study // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* — 1999. — 25. — Suppl. 4. — S25–S31.
31. **Hodis H.N., Mack W.J., LaBree L.** et al. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events // *Ann. Intern. Med.* — 1998. — 128. — P. 262–269.
32. **Koscielny J., Klussendorf D., Latza R.** et al. The anti-atherosclerotic effect of *Allium sativum* // *Atherosclerosis*. — 1999. — 144(1). — P. 237–249.
33. **Lavu M., Bhushan S., Lefer D.J.** Hydrogen sulfide-mediated cardioprotection: mechanisms and therapeutic potential // *Clin. Sci. (Lond.)*. — 2011. — 120(6). — P. 219–229.
34. **Lei Y.P., Liu C.T., Sheen L.Y.** et al. Diallyl disulfide and diallyl trisulfide protect endothelial nitric oxide synthase against damage by oxidized low-density lipoprotein // *Mol. Nutr. Food Res.* — 2010. — 54. — Suppl. 1. — S42–S52.
35. **Libby P.** Inflammation and cardiovascular disease mechanisms // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2006. — 83(2). — P. 456–460.
36. **Lonn E.M., Yusuf S., Jha P.** et al. Emerging role of angiotensin-converting enzyme inhibitors in cardiac and vascular protection // *Circulation*. — 1994. — 90. — P. 2056–2069.
37. **Lonn E., Yusuf S., Dzavik V.** et al. SECURE Investigators. Effects of ramipril and vitamin E on atherosclerosis: the study to evaluate carotid ultrasound changes in patients treated with ramipril and vitamin E (SECURE) // *Circulation*. — 2001. — Feb. 20. — 103(7). — P. 919–925.
38. **Mack W.J., Krauss R.M., Hodis H.N.** Lipoprotein subclasses in the Monitored Atherosclerosis Regression Study (MARS). Treatment effects and relation to coronary angiographic progression // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 1996. — May. — 16 (5). — P. 697–704.
39. **Masood D.E., Roach E.C., Beauregard K.G., Khalil R.A.** Impact of sex hormone metabolism on the vascular effects of menopausal hormone therapy in cardiovascular disease // *Curr. Drug Metab.* — 2010. — 11(8). — P. 693–714.
40. **McFarlane S.I., Muniyappa R., Francisco R., Sowers J.R.** Clinical review 145: Pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2002. — Apr. — 87(4). — P. 1451–1458.
41. **McTavish D., Sorkin E.M.** Pravastatin. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in hypercholesterolaemia // *Drugs*. — 1991. — Jul. — 42 (1). — P. 65–89.
42. **Mitchell J.R., Schwartz C.J.** Relationship between arterial disease at different sites // *Br. Med. J.* — 1962. — 1. — P. 1293–1301.
43. **Nissen S.E., Tsunoda T., Tuzcu E.M.** et al. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial // *JAMA*. — 2003. — 290. — P. 2292–2300.
44. **O’Leary D.H., Polak J.F., Kronmal R.A.** et al. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group // *N. Engl. J. Med.* — 1999. — 340. — P. 14–22.
45. **Orekhov A.N., Sobenin I.A., Korneev N.V.** et al. Anti-Atherosclerotic Therapy Based on Botanicals // *Recent Pat. Cardiovasc. Drug Discov.* — 2012.
46. **Orekhov A.N., Tertov V.V., Pokrovsky S.N.** et al. Blood serum atherogenicity associated with coronary atherosclerosis. Evidence for non-lipid factor providing atherogenicity of low-density lipoproteins and an approach to its elimination // *Circ. Res.* — 1988a. — 62(3). — P. 421–429.
47. **Pellegrini C.N., Vittinghoff E., Lin F.** et al. Statin use is associated with lower risk of atrial fibrillation in women with coronary disease: the HERS trial // *Heart*. — 2009. — 95(9). — P. 704–708.
48. **Pitt B., Byington R.P., Furberg C.D.** et al. Effect of amlodipine on the progression of atherosclerosis and the occurrence of clinical events. PRE-VENT Investigators // *Circulation*. — 2000. — 102(13). — P. 1503–1510.
49. **Prasad K.** Natural products in regression and slowing of progression of atherosclerosis // *Curr. Pharm. Biotechnol.* — 2010. — 11(8). — P. 794–800.
50. **Probstfield J.L., Margitit S.E., Byington R.P.** et al. Results of the primary outcome measure and clinical events from the Asymptomatic Carotid Artery Progression Study // *Am. J. Cardiol.* — 1995. — Sep. 28. — 76 (9). — 47C–53C.
51. **Reinhart K.M., Talati R., White C.M., Coleman C.I.** The impact of garlic on lipid parameters: a systematic review and meta-analysis // *Nutr. Res. Rev.* — 2009. — 22(1). — P. 39–48.
52. **Salonen J.T., Salonen R.** Ultrasound B-mode imaging in observational studies of atherosclerotic progression // *Circulation*. — 1993. — 87. — P. 1156–1165.

53. *Salonen R., Nyssonen K., Porkkala-Sarataho E., Salonen J.T.* The Kuopio Atherosclerosis Prevention Study (KAPS): effect of pravastatin treatment on lipids, oxidation resistance of lipoproteins, and atherosclerotic progression // *Am. J. Cardiol.* — 1995. — Sep. 28. — 76 (9). — 34C-39C.
54. *Simon A., Giral P., Levenson J.* Extracoronary atherosclerotic plaque at multiple sites and total coronary calcification deposit in asymptomatic men. Association with coronary risk profile // *Circulation.* — 1995. — 92. — P. 1414-1421.
55. *Simon A., Garipey J., Moyses D., Levenson J.* Differential effects of nifedipine and co-amlozide on the progression of early carotid wall changes // *Circulation.* — 2001. — Jun. 19. — 103(24). — P. 2949-2954.
56. *Smilde T.J., van Wissen S., Wollersheim H.* et al. Effect of aggressive versus conventional lipid lowering on atherosclerosis progression in familial hypercholesterolaemia (ASAP): a prospective, randomised, double-blind trial // *Lancet.* — 2001. — Feb. 24. — 357 (9256). — P. 577-581.
57. *Smith N.L., Wiley J.R., Legault C.* et al. Effect of progestogen and progestogen type on hemostasis measures in postmenopausal women: the Postmenopausal Estrogen/Progestin Intervention (PEPI) Study // *Menopause.* — 2008. — 15(6). — P. 1145-1150.
58. *Takemoto M., Liao J.K.* Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2001. — Nov. — 21(11). — P. 1712-1719.
59. *Tardif J.C., Lesage F., Harel F.* et al. Imaging biomarkers in atherosclerosis trials // *Circ. Cardiovasc. Imaging.* — 2011. — 4. — P. 319-333.
60. *Tardif J.C., Gregoire J., L'Allier P.L.* et al. Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial // *JAMA.* — 2007. — 297. — P. 1675-1682.
61. *Taylor A.J., Kent S.M., Flaherty P.J.* et al. ARBITER: Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol: a randomized trial comparing the effects of atorvastatin and pravastatin on carotid intima medial thickness // *Circulation.* — 2002. — Oct. 15. — 106 (16). — P. 2055-2060.
62. *Taylor A.J., Sullenberger L.E., Lee H.J.* et al. Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol (ARBITER) 2: a double-blind, placebo-controlled study of extended-release niacin on atherosclerosis progression in secondary prevention patients treated with statins // *Circulation.* — 2004. — Dec. 7. — 110 (23). — P. 3512-357.
63. *Taylor A.J., Lee H.J., Sullenberger L.E.* The effect of 24 months of combination statin and extended-release niacin on carotid intima-media thickness: ARBITER 3 // *Curr. Med. Res. Opin.* — 2006. — Nov. — 22 (11). — P. 2243-2250.
64. *Taylor A.J., Villines T.C., Stanek E.J.* et al. Extended-release niacin or ezetimibe and carotid intima-media thickness // *N. Engl. J. Med.* — 2009. — Nov. 26. — 361(22). — P. 2113-2122.
65. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels // *N. Engl. J. Med.* — 1998. — Nov. 5. — 339 (19). — P. 1349-1357.
66. *Vidyashankar S., Sambaiah K., Srinivasan K.* Regression of preestablished cholesterol gallstones by dietary garlic and on- ion in experimental mice // *Metabolism.* — 2010. — 59. — P. 1402-1412.
67. *Verhamme P., Kerkhof F., Buyschaert I.* et al. Carotid intima-media thickness: more than a research tool? // *Acta Cardiol.* — 2010. — Feb. — 65(1). — P. 59-66.
68. *Waksman R., Torguson R., Kent K.M.* et al. A first-in-man, randomized, placebo-controlled study to evaluate the safety and feasibility of autologous delipidated high-density lipoprotein plasma infusions in patients with acute coronary syndrome // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2010. — 55. — P. 2727-2735.
69. *Weinstein D.B., Heider J.G.* Antiatherogenic properties of calcium antagonists // *State of the art // Am. J. Med.* — 1989. — Apr. 17. — 86(4A). — P. 27-32.
70. *Werner N., Nickenig G., Laufs U.* Pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors // *Basic Res. Cardiol.* — 2002. — Mar. — 97(2). — P. 105-116.
71. *Zanchetti A., Rosei E.A., Dal Palu C.* et al. The Verapamil in Hypertension and Atherosclerosis Study (VHAS): results of long-term randomized treatment with either verapamil or chlorthalidone on carotid intima-media thickness // *J. Hypertens.* — 1998. — Nov. — 16(11). — P. 1667-1676.

Поступила 25.04.13

Сведения об авторах:

Аладинский Владимир Александрович, студент МФТИ

Карагодин Василий Петрович, канд. биол. наук, НИИ Институт атеросклероза, Инновационный Центр Сколково
Мельниченко Александра Александровна, канд. биол. наук, НИИ Институт атеросклероза, Инновационный Центр Сколково

Орехова Варвара Александровна, канд. мед. наук, НИИ Институт атеросклероза, Инновационный Центр Сколково
Орехов Александр Николаевич, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Собенин Игорь Александрович, д-р мед. наук, вед. науч. сотр. ФГБУ «НИИОПП» РАМН, НИИ атеросклероза РАЕН

А.С. Акопов¹, А.А. Московцев^{1,3}, С.А. Доленко², Г.Д. Савина³

Кластерный анализ в медико-биологических исследованиях

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

² Научно-исследовательский институт ядерной физики им. Д.В. Скобельцына Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, ГСП-1, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2

³ Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия последиplomного образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123995, Москва, ул. Баррикадная, 2/1

*Кластерный анализ является одним из наиболее популярных методов анализа многопараметрических данных. Применение кластерного анализа позволяет выявить внутреннюю структуру данных, сгруппировать отдельные наблюдения по степени их схожести. В обзоре дается определение основных понятий кластерного анализа, а также рассматриваются наиболее популярные алгоритмы кластеризации: *k*-средних, иерархические алгоритмы, алгоритмы на базе сетей Кохонена. Также приводятся примеры использования данных алгоритмов в медико-биологических исследованиях.*

Ключевые слова: кластерный анализ, многопараметрическая статистика, кластер, *k*-средних, иерархические алгоритмы, искусственные нейронные сети, сеть Кохонена

A.S. Akopov¹, A.A. Moskovtsev^{1,3}, S.A. Dolenko², G.D. Savina³

Cluster analysis in biomedical researches

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

² Skobeltsyn Institute of Nuclear Physics, Moscow State University, 1, bld.2, Leninskiye Gory, Moscow, GSP-1, 119991, Russia

³ Russian Medical Academy of Postdegree Education, 2/1, Barrikadnaya str., 123836, Moscow, Russia

*Cluster analysis is one of the most popular methods for the analysis of multi-parameter data. The cluster analysis reveals the internal structure of the data, group the separate observations on the degree of their similarity. The review provides a definition of the basic concepts of cluster analysis, and discusses the most popular clustering algorithms: *k*-means, hierarchical algorithms, Kohonen networks algorithms. Examples are the use of these algorithms in biomedical research.*

Key words: cluster analysis, multi-parameter statistics, cluster, *k*-means, hierarchical algorithms, artificial neural networks, Kohonen network

Задача группировки объектов, однородных по тем или иным параметрам, является актуальной для многих областей науки и техники и имеет длительную историю развития инструментов для ее решения. Попытки введения систематики живых организмов относятся к античности [14]. Примерами решения подобных задач в настоящее время в медико-биологических исследованиях служат: выделение групп пациентов на основе набора клинических показателей [8, 57]; разделение экспериментальной выборки на группы единиц со схожими профилями регистрируемых в опыте показателей [11]; построение таксономии микроорганизмов на основе диагностических и биохимических тестов [39, 50]; классификация образцов опухолевых тканей по профилям экспрессии генов [17, 33]; сегментация (т.е.

выделение однородных участков изображения) в нейровизуализационных технологиях [21].

Несмотря на разнообразие группируемых объектов (ткани, организмы, биологические виды, пиксели изображения), в этих исследованиях используются сходные методики, объединенные под названием «кластерный анализ». Термин был введен в 1936 г. [76], однако прообразы кластерного анализа можно встретить в более ранних работах (метод корреляционных плеяд Чекановского [22]). Бурное развитие методик и алгоритмов кластерного анализа началось со 2-й половины XX века, в связи с развитием вычислительной техники, и формированием направления *datamining* в информационных технологиях. В медико-биологических исследованиях кластерный анализ наиболее широко используется в связи с высокопроизводительными методами исследований, такими, как биологические микрочипы (*microarrays*) и секвенирование следующего поколения (*next generation sequencing*).

Для корреспонденции: Акопов Александр Сергеевич, инженер лаб. тромбозиса и тромбогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: asakopov@gmail.com

Datamining (рус. — добыча данных, интеллектуальный или глубинный анализ данных) — совокупность методик, направленных на обнаружение скрытой информации, знаний и закономерностей в крупных массивах данных, как правило, — сведенных в компьютерные базы данных. Помимо кластерного анализа к *datamining* относят дискриминантный, корреляционный и регрессионный анализ, факторный анализ, анализ временных рядов, анализ выживаемости, анализ связей и многие другие методики анализа данных.

Основные определения

Кластерный анализ (кластеризация) — способ группировки многомерных объектов, основанный на представлении результатов отдельных наблюдений точками подходящего геометрического пространства с последующим выделением групп как «сгустков» этих точек («Кластер» — англ. — сгусток, гроздь, скопление) [9]. Существует ряд синонимичных терминов: автоматическая классификация, нумерическая, статистическая или цифровая таксономия. С точки зрения теории машинного обучения (ТМО), кластеризация относится к задачам обучения без учителя, т.е. адаптивный алгоритм при обучении использует только входные данные. Это отличает ее от классификации, при проведении которой алгоритм сначала обучается на выборке данных с заданным разделением на классы, корректируя свою работу для соответствия этому разделению [4].

Определения кластера могут различаться в зависимости от задачи, решаемой при проведении анализа [19]. Одним из наиболее распространенных является следующее: *кластер* — подмножество набора данных, в котором каждый элемент ближе или более схож (в каком-либо смысле) с каждым из элементов, принадлежащих данному подмножеству, чем с любым из элементов, ему не принадлежащих [72].

Также разнообразны, в зависимости от прикладной области, термины, обозначающие единицу дан-

ных, подвергаемых кластеризации: событие, единица, объект, наблюдение, пример, паттерн, образ, операционная таксономическая единица. В общем случае, *единица данных* представляет собой вектор (т.е. упорядоченный набор значений) признаков. *Признаками (атрибутами)* являются характеристики изучаемых объектов, например: уровень экспрессии данного гена в образце, значение какого-либо клинического показателя пациента, интенсивность по одному из цветовых каналов пикселя изображения. Вообще неоднородность терминологии характерна для кластерного анализа, так как метод формировался в рамках различных прикладных дисциплин [15].

Признаки, описывающие объект, могут выражаться в различных шкалах, что важно с точки зрения для применимости того или иного алгоритма кластерного анализа [66]. Наиболее общепринятая классификация [71] выделяет 4 вида шкал, в зависимости от вида представляемых данных, возможных преобразований и вводимых отношений между объектами (табл. 1).

Расстояния, метрики, меры сходства

Схожесть объектов является критерием их помещения в один кластер. Более формальными критериями в алгоритмах кластеризации выступают расстояния, метрики, меры сходства и различия, являющиеся функциями двух аргументов (обозначение — x, y), в качестве которых выступают объекты. Кроме них в тех же целях могут использоваться: коэффициенты корреляции или ассоциации, вероятностные меры сходства [68]. *Функция расстояния* $d(x, y)$ определяется следующими очевидными свойствами [23]:

1. Неотрицательность $d(x, y) \geq 0$ (отрицательное расстояние не имеет смысла);
2. Симметричность $d(x, y) = d(y, x)$ (расстояние от первой точки до второй равно расстоянию, измеренному в обратном направлении);
3. Свойство идентификации $d(x, x) = 0$ (расстояние от точки до нее самой равно нулю).

Таблица 1

Сравнение шкал представления данных

Название	Возможные отношения, устанавливаемые для значений признака	Примеры
Абсолютная	Больше/меньше/равно, на сколько и во сколько раз	Рост, вес индивида; концентрация молекул в растворе
Интервальная (Разностей)	Больше/меньше/равно, на сколько	Температура
Ординальная	Больше/меньше/равно	Классификация эссенциальной гипертензии по ВОЗ (I, II, III стадии)
Номинальная	Равно	Пол, цвет

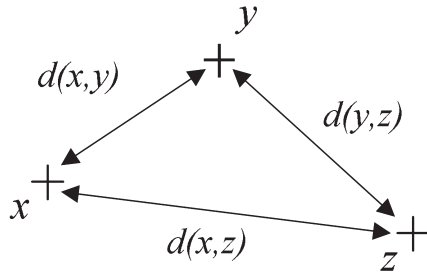


Рис. 1. Иллюстрация аксиомы треугольника: сумма расстояний $d(x,y)$ и $d(y,z)$ больше $d(x,z)$. Равенство может выполняться при условии расположения точки u на прямой, соединяющей x и z .

Определение метрики [6] включает в себя вышеперечисленные свойства (неотрицательность, симметричность, свойство идентификации) и дополняется следующими:

4. Свойство определенности $d(x,y) = 0$, если и только если $x = y$ (расстояние между точками нулевое лишь при совпадении этих точек);

5. Неравенство треугольника: $d(x,z) \leq d(x,y) + d(y,z)$ (сумма расстояний $d(x,y)$ и $d(y,z)$ больше или равна $d(x,z)$) — см. рис. 1.

Для упрощения дальнейшего изложения опустим различия между понятиями *расстояние* и *метрика*.

Обобщением понятий метрики и расстояния является мера сходства (различия) S , которая определяется менее строгим набором свойств [32]:

1. Неотрицательность $S(x,y) \geq 0$;
2. Симметричность $S(x,y) = S(y,x)$;
3. Монотонное возрастание $S(x,y)$ по мере того, как выбираются более схожие (различные), в каком либо смысле, объекты x и y .

Выбор меры сходства между объектами для кластеризации может определяться шкалой, в которой представлены признаки объектов, используемым алгоритмом, характеристиками самих данных (видом распределения признаков). Часто при работе алгоритмов необходимо определять не только расстояния между объектами, но и расстояния между кластерами.

Расстояния между числовыми данными. Одно из наиболее известных расстояний между векторами из n числовых признаков — Евклидово:

$$d^2(x, y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2},$$

где x_i и y_i — значения i -х признаков объектов x и y .

Данная метрика относится к семейству метрик Минковского, представимых следующей общей формулой:

$$dp(x, y) = \sqrt[p]{\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^p},$$

где p может принимать значения от 1 до бесконечности (для Евклидовой метрики $p = 2$).

К этому семейству также относится Манхэттенская метрика (или «расстояние городских кварталов»), случай для $p = 1$:

$$d^1(x, y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n |x_i - y_i|}.$$

Недостатком Евклидовой метрики является тенденция к формированию кластеров одинакового размера и сферических по форме [37], что может приводить к искажению реального распределения данных по кластерам (рис. 2). В то же время, признаки, измеренные по шкале с более широким размахом, будут сильнее влиять на значение расстояния. Манхэттенское расстояние менее чувствительно к таким особенностям данных.

Расстояния между строковыми объектами. В ряде приложений используется расстояние Хэмминга — метрика, используемая для сравнения векторов равной длины, которые образованы признаками с конечным набором значений (например, строки, записанные в определенном алфавите). Например, она может использоваться для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот или белков одного размера [51]. Значение метрики Хэмминга определяется как количество несовпадающих значений в соответствующих позициях последовательностей [59]. Например, для двух пентануклеотидных последовательностей: $d_{Ham}(agtcc, agaat) = 3$.

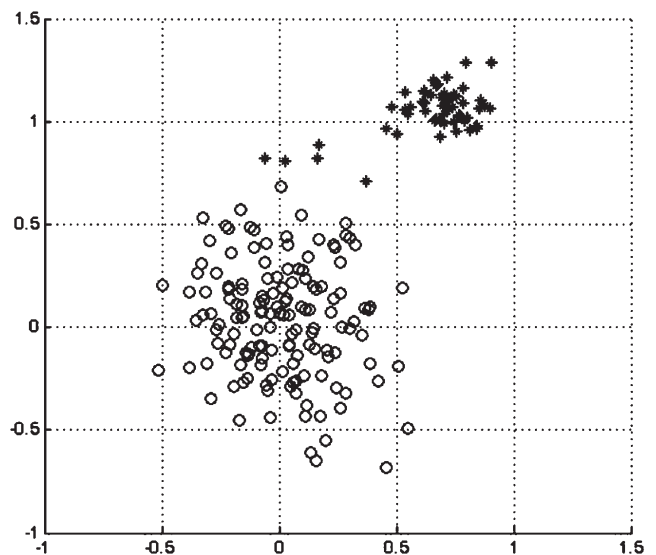


Рис. 2. Разделение данных на кластеры алгоритмом k -средних с использованием Евклидовой метрики. Характеристики групп данных: кластер 1 — кружок; кластер 2 — звездочка. Пять точек, принадлежащих кластеру 1 (более разреженному и многочисленному), ошибочно отнесены алгоритмом к кластеру 2.

Категории алгоритмов кластерного анализа

По структуре получаемых кластеров		
Разделительные (partitional) — объекты распределены между кластерами одного уровня.	Иерархические (hierarchical) — объекты распределены между кластерами, образующими иерархическую структуру. Имеется серия все более мелких разбиений.	
По принадлежности объектов кластеру		
Эксклюзивные (exclusive) или "жесткие" (hard): каждый из объектов относится к одному кластеру.	Перекрывающиеся (overlapping): один объект может быть отнесен сразу к нескольким кластерам.	Нечеткие (fuzzy) и вероятностные (probabilistic): один пример — набор чисел, выражающих степень принадлежности к кластерам. Если сумма чисел равна 1 кластеризация описывает вероятность принадлежности к кластеру.
По способу определения числа кластеров		
Число кластеров определяется пользователем.	Число кластеров определяется в ходе выполнения алгоритма.	
Использование адаптивных алгоритмов		
Не используются.	С использованием искусственных нейронных сетей (ИНС).	С использованием генетических алгоритмов (ГА).

Также использование расстояния Левенштейна, которое, в отличие от предыдущего, не накладывает ограничений на длину сравниваемых последовательностей. Расстояние Левенштейна определяется как минимальное количество удалений и вставок одного символа, а также замены его на другой до получения одной строки из другой [7]. Здесь недостатком является то, что данное расстояние между совершенно различными короткими строками оказывается небольшим, а между достаточно длинными и при том похожими может быть гораздо больше.

Матрицы расстояний (сходства). Естественным представлением кластеризуемых данных является матрица, у которой строки (столбцы) соответствуют кластеризуемым единицам, а столбцы (строки, соответственно) признакам этих единиц. Однако часто при работе алгоритмов кластеризации строится матрица, строки и столбцы которой соответствуют кластеризуемым объектам, а на их пересечении записаны расстояния или значения расстояний (меры сходства) между соответствующими объектами [10].

Категоризация алгоритмов

Существующие классификации кластерного анализа не являются абсолютно исчерпывающими и однозначными, во многом потому, что разработка алгоритмов осуществлялась специалистами разных областей, для специфических задач и типов данных. В основе большинства классификаций лежат разные критерии распределения объектов по кластерам, и даже разное понимание того, что такое кластер [29]. Отечественными авторами предложена достаточно подробная классификация методов кластерного анализа [2].

Многие алгоритмы могут обладать характеристиками, позволяющими отнести их сразу к нескольким

классам. Помимо собственно классификации, т.е. разделения всех алгоритмов на однородные группы, возможны и другие способы описания структуры методов кластерного анализа. В табл. 2 приведены характеристики, по которым можно разделить алгоритмы на формализованные категории.

Другие варианты классификации методов кластерного анализа можно найти в ряде работ [5, 36, 40].

Далее представлено описание и приведены примеры использования наиболее распространенных алгоритмов, применяемых в кластерном анализе.

Алгоритм *k*-средних

Подход предложен Г. Штейнгаузом в 1956 г. [70] и С. Ллойдом в 1957 г. [49] и на сегодняшний день является одним из наиболее часто используемых. Алгоритм является разделительным, с количеством кластеров, задаваемым пользователем, и жестким распределением объектов по ним. Основной особенностью алгоритма является распределение точек-объектов анализируемых данных по *k* (заранее заданное число) кластерам, на основании их близости к центроидам. В качестве центроида данного кластера берется объект, имеющий значения признаков, усредненных по всем объектам, принадлежащим данному кластеру (рис. 3).

Описание алгоритма

В процессе выполнения алгоритма циклически (итеративно) осуществляются следующие действия:

1) каждый объект приписывается ближайшему (обычно, в смысле Евклидовой метрики) центроиду, в результате чего образуются кластеры;

2) для каждого кластера заново рассчитывается центроид;

3) процедура повторяется.

Таким образом, в работе алгоритма циклически осуществляется изменение координат центроидов и перераспределение объектов между ними. Остановка алгоритма происходит в случае отсутствия изменения координат центроидов, при изменении их ниже заданного порогового значения, либо после заданного числа повторений процедуры. При работе алгоритма решается задача минимизации суммы квадратов расстояний (СКР) между точками и центроидами. Перед началом циклической процедуры происходит инициализация алгоритма множеством анализируемых объектов, а также начальными координатами для k центроидов.

Преимущества алгоритма:

- хорошая производительность при достаточно большом объеме данных;
- в случае «хорошей» разделенности и геометрии кластеров в структуре исходных данных, алгоритм сходится за небольшое число итераций.

Недостатки:

- исследователь должен сделать как можно более правдоподобное предположение о числе кластеров в структуре данных до начала работы алгоритма;
- медленная работа на больших объемах данных;
- хорошо разделяются только сферические кластеры, т.е. кластеры с равномерным разбросом значений по признакам (следствие минимизации суммы квадратов расстояний);
- зачастую алгоритм достигает только локальный минимум СКР, т.е. разбиение не отражает реальную структуру данных (что соответствует достижению глобального минимума).

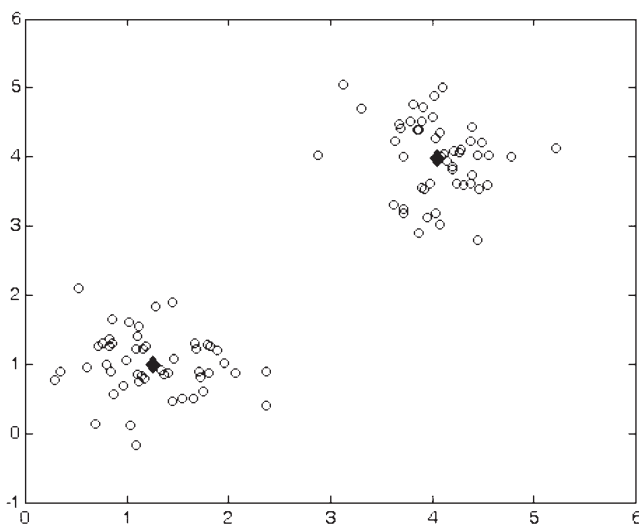


Рис. 3. Центроиды (темные ромбы) двух кластеров, образованных данными, имеющими двумерное нормальное распределение (светлые кружки). Координаты центроида определяются как среднее соответствующих координат объектов кластера.

С последним тесно связана проблема инициализации центроидов [54]. Их «попадание» в один и тот же кластер в начале работы алгоритма ведет к его разбиению, в то время как истинный кластер, в который «не попал» ни один центроид, не выделяется. Стабильность разбиения на кластеры может подтверждаться путем многократного повторения процедуры. Кроме того, для минимизации влияния инициализации можно воспользоваться рядом усовершенствований метода k -средних. Например, используется следующий алгоритм для распределения центроидов [42]:

1. Первым из k центроидов назначается наиболее центральный из кластеризуемых объектов;

2. Следующими центроидами назначаются объекты, вокруг которых группируется максимальное число других объектов.

Также используют подход с равномерным распределением центроидов [37]:

1. Первым из k центроидов назначается выбранный случайно объект или точка, являющаяся центром выборки;

2. Следующими центроидами назначаются объекты, максимально удаленные от выбранных на предыдущем шаге.

В литературе предлагается и рассматривается ряд других усовершенствований процедуры инициализации [28, 31, 34, 75].

Применение алгоритма k -средних

Кластеризация временных профилей экспрессии генов Saccharomyces cerevisiae в клеточном цикле [73]

В работе анализировались данные экспрессии для 3000 генов [20], полученные методом ДНК-микрочипов [64]. После предварительной обработки экспериментальных данных, каждый ген описывался вектором значений уровней экспрессии во времени (15 значений). Для нахождения глобального максимума функции СКР использовалось 200 повторов работы алгоритма, что обеспечивало стабильно воспроизводимый результат кластеризации. Инициализация алгоритма осуществлялась с помощью равномерного распределения центроидов. Валидацию результата проводили путем выявления функционально близких генов в одном кластере, причем статистически значимое обогащение функциональными категориями наблюдалось для 15 кластеров из 30 и совпадало с наиболее «плотными» кластерами. Кроме того, для генов 12 кластеров были обнаружены общие регуляторные мотивы (всего 18 мотивов), причем наличие семи из них было подтверждалось экспериментально до исследования. Таким образом, кластерный анализ позволил выявить наличие функциональных связей между генами, которые подтверждались как существующими данными об их функциях, так и общими механизмами регуляции.

Изучение зависимости экспрессии генов в печени крыс от пола и возраста [47]

В исследовании изучались данные экспрессии генов крыс 9 возрастных групп обоих полов, полученные методом ДНК-микрочипов. После предобработки, матрица данных была образована 7951 объектом (точки на микрочипах, соответствующие 3770 дифференциально экспрессируемым генам), каждый из которых характеризовался уровнями экспрессии в 9 временных точках (возраст от 2 до 104 недель). Значение k устанавливалось равным 30, что соответствовало наименьшему числу кластеров, при котором коэффициент корреляции любых двух точек внутри каждого из них составлял не менее 0,7. Многие кластеры представляли собой профили экспрессии генов, которые могли быть интерпретированы в физиологическом контексте: зависимость уровней экспрессии от стадии развития организма. Некоторые кластеры обладали негативной корреляцией друг с другом (гены-«антагонисты»).

Выявление типов сигнальных путей в мононуклеарных периферических клетках крови, активируемых в период обострения бронхиальной астмы [18]

Активация сигнальных путей определялась по изменению уровней экспрессии генов в мононуклеарных периферических клетках крови (МПКК) из образцов, забранных у пациентов в период обострения по сравнению со спокойным периодом. Изучались 166 образцов МПКК, полученных от лиц, страдающих бронхиальной астмой II, III и IV степеней. В отличие от приведенных выше исследований, кластеризация проводилась по образцам, а не по временным профилям генов. Таким образом, большие разделялись на кластеры по профилям экспрессии генов МПКК в стадии обострения заболевания. Значение k было выбрано равным 3 в результате оценки качества разделения на кластеры при различных k с помощью silhouette-статистики (см. приложение). С той же целью использовались повторные кластеризации с искусственным добавлением шума к данным [53]. В результате проведенного анализа 3 полученных кластера были охарактеризованы по особенностям профилей экспрессии генов в МПКК: 1-й — с активацией генов сигнальных путей врожденного иммунитета (сигнальные пути TLR и рецепторов интерферона); 2-й — с активацией генов антиген-зависимых путей (сигнальные пути T- и B-клеточных рецепторов, а также рецепторов ИЛ-4); 3-й — без ярко выраженных особенностей. Таким образом, авторами была показана гетерогенность молекулярных механизмов протекания заболевания в стадии обострения.

Кластеризация генов

для последующей реконструкции динамической сетевой модели их взаимодействия в условиях протекания инфекции вирусом гриппа H1N1 [24]

Исследовались уровни экспрессии генов в легочной ткани мышей в различных временных точках после инфицирования вирусом гриппа H1N1 методом ДНК-микрочипов. В данном исследовании кластерный анализ проводился на этапе подготовки данных для последующего построения с их помощью компьютерной модели сети взаимодействия генов. При этом моделирование было бы не возможно без снижения размерности данных ввиду их большого объема. Исследователями было принято решение об объединении групп генов в кластеры с последующим их представлением в модели центроидами или отдельными представителями соответствующих кластеров. Данные после предобработки анализировались с помощью алгоритма k -средних, с использованием расстояния Евклида (учитывает, прежде всего, сонаправленность изменений экспрессии). Устойчивость разбиения на кластеры достигалась повторением процедуры более 100 раз, начальные центроиды выбирались случайным образом из кластеризуемых объектов при каждом повторе. Оптимальное число кластеров определяли осуществляя пробные кластеризации со значением k от 10 до 80 и оценивая качество получаемых кластеров по индексу Дана (см. приложение), а также их обогащенности функционально близкими генами.

Иерархические алгоритмы кластерного анализа

Иерархические алгоритмы (или алгоритмы таксономии) образуют семейство крайне популярных методик кластерного анализа: по данным исследования библиографических баз данных иерархические методики оказались наиболее используемы в публикациях за 2003 г. [43]. Результатом проведения иерархической кластеризации является дендрограмма — древовидная структура, объединяющая кластеризуемые объекты (рис. 4 А,Б), и образующая систему вложенных разбиений [3].

Алгоритмы иерархического кластерного анализа дают наглядное представление о структуре кластеров и отношении близости объектов в них. К прочим преимуществам иерархических методов относятся [16]:

- гибкость в выборе степени разбиения данных (возможен выбор любого числа кластеров, на которые разбиваются данные);
- возможность использования различных мер сходства, расстояний, применимых к различным типам данных.

Недостатки, свойственные иерархическому подходу:

- окончательный выбор числа кластеров не очевиден, и не может базироваться лишь на результате работы алгоритма;

• отсутствует возможность перераспределения объектов, уже объединенных в кластеры.

Иерархические методы делятся на агломеративные и дивизимные [28]. Двигаясь с нижнего уровня вверх, агломеративные процедуры объединяют объекты во все более крупные кластеры, заканчивая формированием одного корневого кластера, объединяющего все объекты. В противоположность, дивизимные алгоритмы осуществляют разделение единого кластера на все более мелкие, вплоть до помещения каждого объекта в индивидуальный кластер. Более распространенными являются агломеративные процедуры.

Агломеративные алгоритмы

Простейшая процедура агломеративного кластерного анализа:

- 1) каждый объект помещается в отдельный кластер;
- 2) строится матрица расстояний или мер близости между кластерами;
- 3) в матрице находятся два ближайших кластера (при первой итерации — объекта), которые объединяются в один;
- 4) алгоритм повторяется, начиная с п.2, до тех пор, пока все объекты не окажутся в одном кластере.

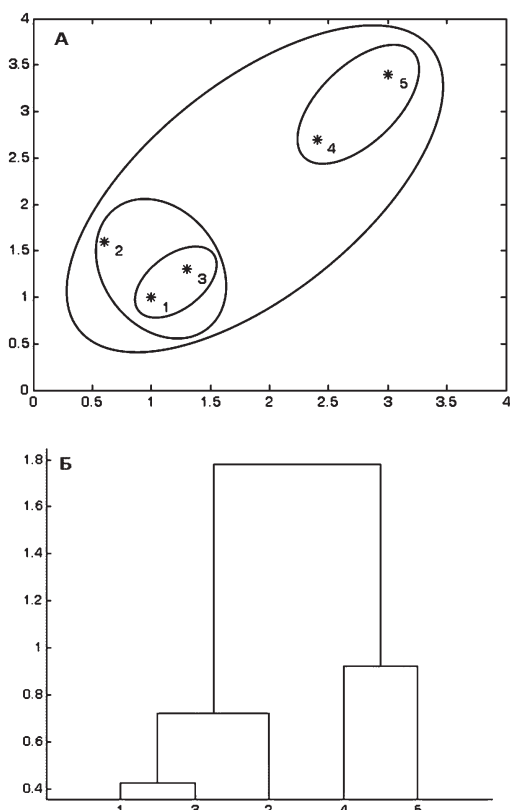


Рис. 4. Построение дендрограммы при иерархической кластеризации: А — данные в двумерном пространстве, состоящие из 5 объектов (звездочки), овалами отражено распределение данных по кластерам разных уровней иерархии; Б — те же кластеры приведены в виде дендрограммы

Как правило, в алгоритме иерархической кластеризации в п.2 и 3 используется один из трех способов определения расстояния между кластерами [30, 40]:

- одиночной связи (single-linkage) [67] — за расстояние между кластерами принимается расстояние между двумя ближайшими объектами этих кластеров;
- полной связи (complete-linkage) [52] — за расстояние между кластерами принимается расстояние между двумя наиболее удаленными объектами этих кластеров;
- средней связи (average-linkage) [69] — расстояние между кластерами определяется как среднее расстояний от объектов одного кластера до объектов другого.

Кроме того, выбор кластеров для объединения может осуществляться с помощью критерия Уорда (Ward's method), использующего целевую функцию, наиболее часто — СКР от точек кластеров до их центроидов. На каждом этапе работы алгоритма выбираются такие два кластера, что при их объединении прирост СКР минимален [63].

Применение алгоритмов иерархической кластеризации

Кластеризация и визуальное представление полногеномных профилей экспрессии генов [27]

В исследовании использовались данные исследования экспрессии генов *Saccharomyces cerevisiae* в различных условиях: при диауксии, в цикле митотического деления, при споруляции, а также при температурном и восстановительном стрессе. Кластерный анализ осуществлялся с помощью агломеративного алгоритма средней связи. В качестве метрики использовалась модификация коэффициента корреляции. Применение иерархического алгоритма позволило сформировать графическую структуру — дендрограмму, отражающую степень близости генов в смысле их коэкспрессии в различных условиях. Для обеспечения лучшего визуального восприятия, профили экспрессии генов были представлены в виде «листьев» дендрограммы, которые образованы цветными ячейками, соответствующими уровню экспрессии гена при данном условии. Гены со сходными функциями оказывались близки на дендрограмме. В частности, это касалось группы генов, кодирующих рибосомальные белки, чья экспрессия подавлялась при стрессе и взаимно коррелировала в течение митотического цикла.

Анализ распределения уровней экспрессии типов рецепторов, связанных с G-белками, в различных тканях мышей [60]

Исследователями анализировались уровни экспрессии 353 рецепторов, связанных с G-белками в 41-й ткани взрослых мышей с помощью метода количественной ПЦР в реальном времени. Данные кластеризовались с помощью алгоритма, использованного

в описанной выше работе [27]. При этом дендрограммы строились как в отношении тканей, так и рецепторов. Выявлены кластеры, образованные тканями иммунной и кроветворной систем (селезенка, костный мозг, тимус), а также центральной нервной системы (кора мозга, гипоталамус, мозжечок, ствол мозга). Многие другие ткани относящиеся к одним системам органов также демонстрировали на дендрограмме близость набора экспрессируемых рецепторов. На базе полученных результатов авторами были выдвинуты гипотезы о ранее неизвестных функциях некоторых рецепторов.

Выявление фенотипов

с высоким риском смертности среди пациентов с хронической обструктивной болезнью легких [19]

Исходными данными для анализа являлись значения клинических показателей 527 пациентов, страдающих ХОБЛ, полученных в рамках проспективного исследования. Среди показателей были как количественные (ИМТ, ФЖЕЛ и др.), так и качественные (номинальные и ординальные данные о сопутствующих заболеваниях, наличии бронхоэктазов, степени утолщения стенок бронхиол и др.). Предобработка данных для кластерного анализа заключалась в преобразовании количественных данных с помощью анализа главных компонент (выделение двух переменных вместо 7, часть из которых демонстрировали взаимную корреляцию), а также построении независимых количественных переменных на основе категориальных данных с помощью метода множественного анализа соответствий (14 переменных). Кластерный анализ осуществляли с использованием критерия Уорда. На основании визуального изучения полученной дендрограммы авторы сделали предположение о наибольшей вероятности разбиений на 3 и 5 кластеров. Анализ смертности для кластеров данных разбиений показал, что между тремя кластерами обнаруживается значительная разница в смертности. В то же время дополнительное разбиение этих кластеров до пяти формирует кластеры со схожими значениями смертности. Таким образом, в исследовании удалось выделить 3 группы пациентов с различными профилями клинических показателей, а также различным прогнозом смертности, используя для кластеризации признаки различной природы.

Адаптивные алгоритмы кластерного анализа

Адаптивные алгоритмы обладают способностью изменять свою работу в зависимости от поступающих данных. Распространенным классом таких алгоритмов являются искусственные нейронные сети (ИНС), в работе которых прослеживаются аналогии с биологическими процессами.

Кластеризация с использованием искусственных нейронных сетей

Искусственные нейронные сети — класс математических моделей, которые возникли и развивались в результате изучения нейрофизиологических процессов, а также попыток их моделирования. В классической работе (1943 г.) У. МакКалока (нейрофизиолог) и В. Питтса (математик-логик) описаны элементарный нейрон, работающий по принципу «все или ничего», а также вычислительные возможности ансамблей таких нейронов [44]. Ф. Розенблатт предложил принципиальную схему и реализацию в виде вычислительной машины нейронной сети (рис. 5), названной перцептрон. Она позволяла распознавать образы (буквы латинского алфавита), обучаясь на тренировочной выборке данных, моделируя тем самым работу головного мозга [10, 61].

В 1969 г. вышла книга М. Мински и С. Пейперта [56], содержащая выводы о невозможности решения ряда задач с помощью перцептронов, в связи с отсутствием надежного алгоритма обучения на тренировочных выборках. Это привело к серьезному охлаждению интереса к ИНС, вплоть до 80-х годов, когда преодоление указанной проблемы послужило толчком к применению ИНС в широком спектре задач «обучения с учителем»

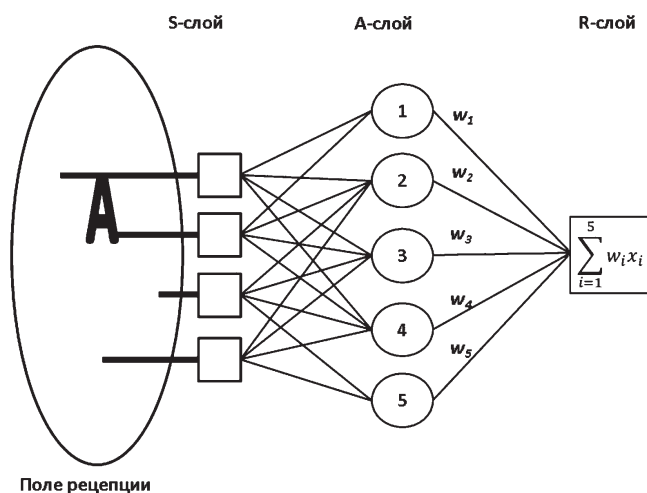


Рис. 5. Перцептрон Розенблатта.

S-слой образован рецепторными элементами, активирующимися при условии их совпадения с участком изображения; A-слой образован ассоциативными элементами, каждый из которых соединен с частью S-элементов и активируется при получении порогового числа сигналов активации последних; при активации элемента слоя S или A элементу следующего слоя передается сигнал x_i , равный 1, в противном случае передается 0. R-слой представлен единственным элементом, выдающим результат 1, если сумма произведений сигналов от предыдущих элементов на соответствующие им веса w_i ($\sum_{i=1}^5 w_i x_i$) больше порогового значения, и -1, если это не так.

При обучении перцептрона происходит подбор весов w_i по определенному правилу, что позволяет ему адаптироваться к поступающим данным для решения конкретной задачи.

[1, 63]. В этот период появились работы Т. Кохонена, описывающие модель ИНС, обучавшихся без учителя (сети Кохонена) и применявшихся автором, в частности, для решения задач кластеризации данных [44, 45]. В настоящее время ИНС находят широкое применение как при решении задач кластеризации и классификации [4], так и ряда других задач, включающих, например, анализ временных рядов [65].

Самоорганизующиеся карты (Кохонена)

Одной из реализаций искусственных нейронных сетей Кохонена являются самоорганизующиеся карты (self-organizing maps, SOM). Сеть Кохонена, предназначенная для обработки n -мерных данных, включает в себя слой нейронов, каждый из которых характеризуется n -мерным вектором весов: $\bar{w}_i = (w_{i1}, \dots, w_{in})$, где i — номер нейрона (рис. 6). Для образования самоорганизующейся карты каждому нейрону также приписываются векторы \bar{m}_i пространства более низкой размерности (как правило, двумерного: $\bar{m}_i = (m_{i1}, m_{i2})$). Векторы этого пространства являются упорядоченными относительно друг друга в прямоугольную, либо гексагональную решетку [46]. Таким образом, нейроны сети представлены в двух пространствах: первое совпадает с пространством анализируемых объектов, а второе служит для отображения последних в упорядоченную структуру (далее — W и M соответственно). Работа сети делится на два этапа: «обучение» и «картирование». На этапе обучения в ответ на предъявляемые данные осуществляется координированная (согласно их соседству в решетке) подстройка весов ней-

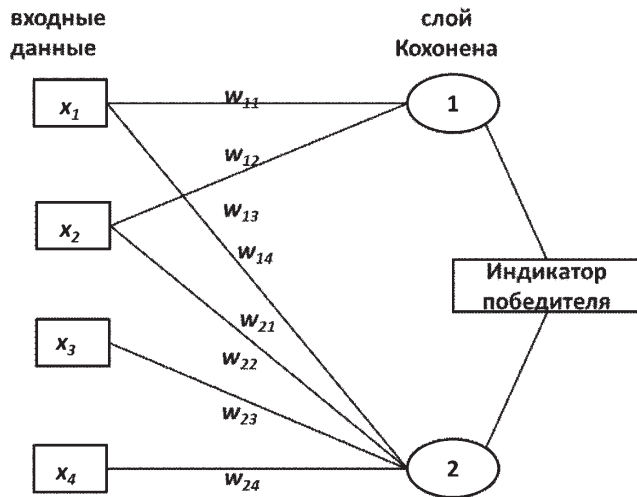


Рис. 6. Сеть Кохонена. Представлена схема ИНС Кохонена, состоящая из двух нейронов и предназначенная для обработки данных 4-мерного пространства (4 числовых признака). В процессе работы сети вектора весов нейронов $\bar{w}_i = (w_{i1}, \dots, w_{i4})$ сравниваются с векторами признаков обрабатываемых объектов $\bar{x} = (x_1, \dots, x_4)$, в результате чего выбирается самый близкий к данному объекту по значениям весов нейрон-победитель.

ронов, в результате чего нейроны равномерно распределяются по анализируемой выборке, сохраняя упорядоченность друг с другом. Алгоритм обучения самоорганизующейся карты Кохонена [13]:

1. Инициализация значений весов нейронов в пространстве W (например, небольшими случайными значениями);
2. Формирование обучающей выборки из кластеризуемых объектов;
3. Для каждого объекта \bar{x} обучающей выборки:
 - вычисление расстояния Евклида между объектом \bar{x} и векторами весов нейронов \bar{w}_i ;
 - определение ближайшего к объекту нейрона — победителя;
 - подстройка весов нейронов сети по формуле:

$$\bar{w}_i^{t+1} = \bar{w}_i^t + \eta(t) \times h_{i,j(\bar{x})}(t) \times (\bar{x} - \bar{w}_i^t),$$

где:

- t — момент дискретного времени предъявления вектора данных \bar{x} ;
- i — порядковый номер нейрона в решетке;
- \bar{w}_i^t и \bar{w}_i^{t+1} — векторы весов в момент предъявления вектора данных \bar{x} и после их подстройки.

Функции $\eta(t)$ и $h_{i,j(\bar{x})}(t)$ зависят от времени выполнения алгоритма и убывают с течением времени. Первая из них определяет скорость обучения сети и может быть определена, например, так: $\eta(t) = \eta_0 \times (1 - t/T)$. В этом выражении η_0 — число в диапазоне от 0 до 1, а T , как видно из соотношения, определяет момент времени, в который обучение останавливается [25]. Функция окрестности $h_{i,j(\bar{x})}(t)$, где $j(\bar{x})$ — номер нейрона-победителя, определяет степень вовлечения в процесс подстройки весов его соседей по решетке в пространстве M . Как правило, она имеет вид либо ступенчатый (для нейронов определенной окрестности 1, для всех остальных 0), либо Гауссовой функции от расстояния между нейрон-победителем $j(\bar{x})$ и остальными нейронами i . Можно видеть, что если функция $h_{i,j(\bar{x})}(t)$ выбирается так, что в подстройке весов на каждом шаге будет участвовать только нейрон-победитель, то алгоритм становится похожим на k -средних. Результатом использования функции окрестности является то, что нейроны соседствующие в пространстве M , сохраняют отношение соседства между нейронами в пространстве W [46].

Описанный алгоритм самоорганизующихся карт основан на нескольких принципах, в которых прослеживается влияние нейрофизиологических моделей. Отображение сложного пространства признаков входных объектов на упорядоченную плоскую структуру-решетку подобно связям анализаторов (моторных, зрительных и других) с соответствующими участками коры. Принцип конкуренции лежит в основе выбора нейрона-победителя. Принцип кооперации реализуется с помощью функции окрестности, опре-

деляющей число нейронов-соседей, подстраивающих свои веса для сближения с входным объектом. Принцип синаптического усиления также связан с подстройкой весов нейрона для сближения с объектом тестовой выборки. В результате нее при поступлении в ИНС аналогичного объекта данный нейрон окажется к нему ближе, таким образом, его распознавание будет более эффективно [13].

На этапе картирования осуществляется распределение анализируемых объектов по кластерам, соответствующим наиболее близким нейронам. Наличие представления каждого нейрона в составе решетки в пространстве M позволяет эффективно визуализировать структуру исходных данных. Так возможна визуализация проанализированных данных в виде набора карт, каждая из которых соответствует одному признаку данных. Карты состоят из ячеек, каждая из которых соответствует представлению нейрона в пространстве низкой размерности M . Ячейки закрашиваются согласно цветовой шкале признака, в зависимости от его значения у нейрона, соответствующего данной ячейке (например, в серой шкале — чем темнее ячейка, тем выше значение признака). Таким образом, просматривая карту за картой, можно получить представление о том, какие признаки отличают кластеры внутри данных друг от друга. Другой вариант визуализации предполагает раскраску карты соответственно расстояниям между векторами, закрашивая более темным ячейки, соответствующие более плотно расположенным векторам [46]. Возможны и другие варианты визуализаций.

Применение самоорганизующихся карт

Выявление наиболее существенных факторов, характерных для лиц с суицидальным поведением [48]

Набор данных образован сведениями о 8699 лицах, характеризующихся 606 признаками, собранными в ходе исследования роли различных факторов в развитии суицидального поведения. Признаки включали социодемографические данные, результаты ответов на вопросы специализированных опросников, сведения о перенесенном в детстве насилии и другие. Использовалась самоорганизующаяся карта с гексагональной решеткой размера 16×12 . Среди признаков присутствовал индикатор, сигнализирующий о факте суицидального поведения. Данный признак использовался для раскрашивания карты с целью выявления кластеров, в который вошло наибольшее число лиц, совершивших попытку суицида. В отобранных таким образом кластерах проводился дальнейший анализ для определения признаков, в наибольшей степени выраженных у лиц совершивших суицидальные попытки.

Классификация пациентов, страдающих сколиотической болезнью [58]

Анализовались данные 1776 пациентов со сколиотической болезнью, в качестве признаков использовались восемь значений углов Кобба (определяются по рентгенограммам), характеризующих искривление позвоночника. Нейроны в пространстве M формировали гексагональную решетку. Для сравнения результатов кластеризации с результатами стандартной клинической классификации, строилась карта, которая раскрашивалась соответственно преобладающему среди пациентов кластера типу классификационных категорий по Ленке (рис. 7).

Также авторами показано, что после обобщения профилей пациентов с помощью самоорганизующейся карты точность прогнозирования областей проведения хирургической коррекции существенно возросла. Таким образом, авторам удалось разработать систему клинической диагностики, потенциально обладающую высокой клинической значимостью.

Определение числа кластеров

Две тесно связанные проблемы кластерного анализа — это контроль качества группировки данных в кластеры и определение оптимального числа последних. Число кластеров k , на которые разбиваются входные данные, зачастую является параметром, который требуется задавать алгоритму перед началом работы. Существует грубая эмпирическая оценка числа кластеров: $k = \sqrt{\frac{n}{2}}$, где n — объектов [38]. В работе Milligan и Cooper 1985 г. проведено сравнительное исследование эффективности 30 процедур, многие из которых используют различные

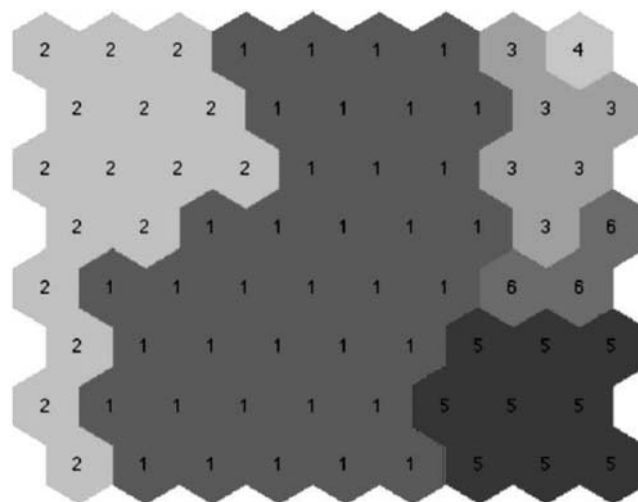


Рис. 7. Гексагональная карта Кохонена, раскрашенная в градациях серого соответственно преобладающей категории клинической классификации Ленке среди пациентов кластеров. Пациенты, относящиеся к одной клинической категории, относятся к близким кластерам. Воспроизведено из [58].

характеристики, вычисляемые для последовательно осуществляемых разбиений с различными k [55]. Более поздняя методика с использованием гар-статистики предлагается в работе [74].

Оценка «качества» кластеризации

Silhouette-статистика

Метод silhouette-статистики [62] относится к техникам анализа «качества» кластеризации объектов. Входными данными для метода являются: матрица расстояний (или сходства) между объектами и данные о распределении объектов по кластерам. Для каждого объекта i рассчитывается показатель:

$$s(i) = \frac{b(i) - a(i)}{\max\{a(i), b(i)\}},$$

где:

$a(i)$ — среднее расстояние от объекта i до объектов кластера к которому он принадлежит;

$b(i)$ — среднее расстояние от объекта i до объектов ближайшего к нему кластера, к которому он не принадлежит.

Показатель s обладает следующим свойством:

$$-1 \leq s(i) \leq 1.$$

Близость $s(i)$ к 1 свидетельствует о «правильном» отнесении объекта i к его кластеру. Близость к 0 говорит о затруднительности выбора двух соседних кластеров для объекта. В случае же близости к -1 можно говорить о том, что объект должен быть отнесен к ближайшему соседнему кластеру.

Графическое представление, предложенное авторами методики, представляет собой столбчатую диаграмму (в оригинале столбцы ориентированы вдоль абсциссы), где столбцы соответствуют объектам и пропорциональны значениям $s(i)$. Столбцы-объекты сгруппированы по кластерам и расположены внутри кластеров в порядке уменьшения $s(i)$. Также на диаграмме для каждого объекта отмечается кластер принадлежности и ближайший соседний кластер. Таким образом, по диаграмме можно делать выводы о качестве распределения объектов по кластерам, а также принимать решение об изменении положения первых относительно вторых.

Максимизация среднего показателя метода Silhouette позволяет рассчитывать на хорошую разделенность кластеров и правильное распределение объектов между ними.

Индекс Данна

Метод Данна [26], аналогично методу силуэта, определяет уровень «качества» процедуры кластеризации. В отличие от последнего, в качестве показателя используется отношение минимального междукластер-

ного расстояния к максимальному внутрикластерному (или диаметру кластера), причем обе эти характеристики могут быть определены различными способами (Δ_i — внутрикластерное расстояние или диаметр; δ_i — междукластерное расстояние; $d(x,y)$ — расстояние между точками (примерами) одного кластера):

- 1) максимальное внутрикластерное расстояние;
- 2) среднее расстояние между примерами;
- 3) среднее расстояние от центра кластера до точки.

Аналогичные варианты оценки δ_i включают: расстояние между двумя ближайшими точками кластеров, среднее расстояние между точками кластеров, расстояние между центроидами кластеров. Ранняя версия индекса Данна предполагала использование первого варианта Δ_i и, соответственно, расстояние между двумя ближайшими точками как междукластерное расстояние (так же и в 5 k -средних). Обобщенные индексы Данна предполагают различные реализации характеристики расстояния или диаметров, в том числе (2) и (3).

Заключение

Кластерный анализ является группой многопараметрических методик анализа, направленных на выявление внутренней структуры данных. Сфера его применения в медико-биологических науках достаточно широка — от обработки данных современных высокопроизводительных молекулярных методик исследований до анализа медико-социальных проблем в области общественного здоровья. Учет преимуществ и недостатков перечисленных методов кластерного анализа необходим для повышения эффективности обработки больших массивов данных.

Список литературы

1. *Барцев С.И., Охонин В.А.* Адаптивные сети обработки информации. Препринт N 59Б // 1986.
2. *Бериков В.С., Лбов Г.С.* Современные тенденции в кластерном анализе // Всероссийский конкурсный отбор обзорно-аналитических статей по приоритетному направлению «Информационно-телекоммуникационные системы». — АНО «Международное образование и наука», 2008.
3. *Воронцов К.В.* Лекции по алгоритмам кластеризации и многомерного шкалирования // 2007.
4. *Ежов А.А., Шумский С.А.* Нейрокомпьютинг и его применения в экономике и бизнесе. — М.: МИФИ, 1998.
5. *Ким Д.-О., Мьюллер Ч.У., Клекка У.Р.* Факторный, дискриминантный и кластерный анализ. — М.: Финансы и статистика, 1989. — 215 с.
6. *Колмогоров А.Н., Фомин С.В.* Элементы теории функций и функционального анализа. — М.: Физматлит, 2006.
7. *Левенштейн В.И.* Двоичные коды с исправлением выпадений, вставок и замещений символов // Доклады Академии Наук СССР. — 1965. — Т. 163, №4. — С. 845–848.
8. *Леонов В.П., Гарганеева Н.П.* Возможности биометрического анализа взаимосвязи соматических показателей и систематики психических расстройств // Сибирский медицинский журнал. — 2001. — №2. — С. 25–32.

9. **Мандель И.Д.** Кластерный анализ. — М.: Финансы и статистика, 1988. — 176 с.
10. **Назаров М.Г.** Курс социально-экономической статистики. — М.: Финстатинформ, ЮНИТИ-ДАНА, 2000. — 771 с.
11. **Похачевский А.Л.** Временной анализ распределения кардиоинтервалов при нагрузочном тестировании // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2011. — №2. — С. 34–40.
12. **Розенблатт Ф.** Принципы нейродинамики. Перцептроны и теория механизмов мозга. — М.: Мир, 1965. — 478 с.
13. **Хайкин С.** Нейронные сети: полный курс. — М.: Вильямс, 2008.
14. **Шуинов А.Б.** Основы теории систематики. — Открытый лицей ВЗМШ, «Книжный дом Университет», 1999. — 56 с.
15. **Aldenderfer M.S.** Cluster analysis. — Beverly Hills: Sage Publications, 1984. — 88 p.
16. **Berkhin P.** A Survey of Clustering Data Mining Techniques // Grouping Multidimensional Data / J. Kogan, C. Nicholas, M. Teboulle. — Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. — P. 25–71.
17. **Bhattacharjee A., Richards W.G., Staunton J., Li C., Monti S., Vasa P., Ladd C., Beheshti J., Bueno R., Gillette M., Loda M., Weber G., Mark E.J., Lander E.S., Wong W., Johnson B.E., Golub T.R., Sagarbaker D.J., Meyerson M.** Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. — 2001. — Vol. 98, №24. — P. 13790–13795.
18. **Bjornsdottir U.S., Holgate S.T., Reddy P.S., Hill A.A., McKee C.M., Csimina C.I., Weaver A.A., Legault H.M., Small C.G., Ramsey R.C., Ellis D.K., Burke C.M., Thompson P.J., Howarth P.H., Wardlaw A.J., Bardin P.G., Bernstein D.I., Irving L.B., Chupp G.L., Bensch G.W., Bensch G.W., Stahlman J.E., Karetzky M., Baker J.W., Miller R.L., Goodman B.H., Raible D.G., Goldman S.J., Miller D.K., Ryan J.L., Dorner A.J., Immermann F.W., O'Toole M.** Pathways Activated during Human Asthma Exacerbation as Revealed by Gene Expression Patterns in Blood // PLoS ONE. — 2011. — Vol. 6, №7. — e21902.
19. **Burgel P.R., Paillasseur J.L., Peene B., Dusser D., Roche N., Coolen J., Troosters T., Decramer M., Janssens W.** Two Distinct Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) Phenotypes Are Associated with High Risk of Mortality // PLoS ONE. — 2012. — Vol. 7, №12. — e51048.
20. **Cho R.J., Campbell M.J., Winzler E.A., Steinmetz L., Conway A., Wodicka L., Wolfsberg T.G., Gabrielian A.E., Landsman D., Lockhart D.J., Davis R.W.** A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle // Mol. Cell. — 1998. — Vol. 2, №1. — P. 65–73.
21. **Clark M.C. Hall, L.O. Goldgof, D.B. Clarke, Laurence P. Velthuisen, R.P. Silbiger, M.S.** MRI segmentation using fuzzy clustering techniques // IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine. — 1994. — Vol. 13, №5. — P. 730–742.
22. **Czekanowski J.** Zur differential Diagnose der Neandertalgruppe // Korrespbl. Dtsch. Ges. Anthropol. — 1909. — №40. — P. 44–47.
23. **Deza E., Deza M.** Dictionary of distances. — Amsterdam, the Netherlands.
24. **Dimitrakopoulou K., Dimitrakopoulou K., Tsimpouris C., Papadopoulos G., Pommerenke C., Wilk E., Sgarbas K.N., Schughart K., Bezerianos A.** Dynamic gene network reconstruction from gene expression data in mice after influenza A (H1N1) infection // Journal of Clinical Bioinformatics. — 2011. — Vol. 1, №1. — P. 27.
25. **Du K.-L.** Clustering: A neural network approach // Neural Networks. — 2010. — Vol. 23, №1. — P. 89–107.
26. **Dunn J.C.** A Fuzzy Relative of the ISODATA Process and Its Use in Detecting Compact Well-Separated Clusters // Journal of Cybernetics. — 1973. — Vol. 3, №3. — P. 32–57.
27. **Eisen M.B., Spellman P.T., Brown P.O., Botstein D.** Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. — 1998. — Vol. 95, №25. — P. 14863–14868.
28. **El Agha M., M. Ashour W.** Efficient and Fast Initialization Algorithm for K-means Clustering // International Journal of Intelligent Systems and Applications. — 2012. — Vol. 4, №1. — P. 21–31.
29. **Estivill-Castro V.** Why so many clustering algorithms // ACM SIGKDD Explorations Newsletter. — 2002. — Vol. 4, №1. — P. 65–75.
30. **Ferreira L., Hitchcock D.B.** A Comparison of Hierarchical Methods for Clustering Functional Data // Communications in Statistics — Simulation and Computation. — 2009. — Vol. 38, №9. — P. 1925–1949.
31. **Forgy E.W.** Cluster analysis of multivariate data: efficiency versus interpretability of classifications // Biometrics. — 1965. — Vol. 21. — P. 768–769.
32. **Gentleman R.** Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor. — New York: Springer Science + Business Media, 2005.
33. **Gevaert O., Daemen A., De Moor B., Libbrecht L.** A taxonomy of epithelial human cancer and their metastases // BMC Med. Genomics. — 2009. — Vol. 2. — P. 69.
34. **Hammerly G., Elkan C.** Alternatives to the k-means algorithm that find better clusterings. — ACM Press, 2002. — P. 600.
35. **Hamming R.W.** Error detecting and error correcting codes // Bell System Tech. J. — 1950. — Vol.2, №29. — P.147–160.
36. **Han J., Kamber M., Pei J.** Data mining: concepts and techniques. 1st Ed. — Amsterdam, 2001.
37. **Han J., Kamber M., Pei J.** Data mining: concepts and techniques. 2nd Ed. — Morgan Kaufmann Publishers, 2006.
38. **Hartigan J.A.** Clustering algorithms. — New York: Wiley, 1975.
39. **Holmberg K., Nord C.E.** Numerical taxonomy and laboratory identification of Actinomyces and Arachnia and some related bacteria // J. Gen. Microbiol. — 1975. — Vol. 91, №1. — P. 17–44.
40. **Jain A.K., Murty M.N., Flynn P.J.** Data clustering: a review // ACM Computing Surveys. — 1999. — Vol. 31, №3. — P. 264–323.
41. **Jianchang Mao, Jain A.K.** A self-organizing network for hyperellipsoidal clustering (HEC) // IEEE Transactions on Neural Networks. — 1996. — Vol. 7, №1. — P. 16–29.
42. **Kaufman L.** Finding groups in data: an introduction to cluster analysis. — New York: Wiley, 1990. — 342 p.
43. **Kettenring J.R.** The Practice of Cluster Analysis // Journal of Classification. — 2006. — Vol. 23, №1. — P. 3–30.
44. **Kohonen T.** Self-organization and associative memory. — Berlin.
45. **Kohonen T.** Self-organized formation of topologically correct feature maps // Biological Cybernetics. — 1982. — Vol. 43, №1. — P. 59–69.
46. **Kohonen T.** Self-organizing maps. — Berlin.
47. **Kwekel J.C., Desai V.G., Moland C.L., Branham W.S., Fuscoe J.C.** Age and sex dependent changes in liver gene expression during the life cycle of the rat // BMC Genomics. — 2010. — Vol. 11, №1. — P. 675.
48. **Leiva-Murillo J.M., Lopez-Castroman J., Baca-Garcia E.** EURECA Consortium. Characterization of Suicidal Behaviour with Self-Organizing Maps // Computational and Mathematical Methods in Medicine. — 2013. — Vol. 2013. — P. 1–9.

49. **Lloyd S.** Least squares quantization in PCM // IEEE Transactions on Information Theory. — 1982. — Vol. 28, №2. — P. 129–137.
50. **Martin R., Riley P.S., Hollis D.G., Weaver R.E., Krichevsky M.I.** Characterization of some groups of gram-negative nonfermentative bacteria by the carbon source alkalization technique // J. Clin. Microbiol. — 1981. — Vol. 14, №1. — P. 39–47.
51. **McCulloch W., Pitts W.** A Logical Calculus of Ideas Immanent in Nervous Activity // 1943. — №5. — P. 115–133.
52. **McQuitty L.L.** Hierarchical Linkage Analysis for the Isolation of Types // Educational and Psychological Measurement. — 1960. — Vol. 20, №1. — P. 55–67.
53. **McShane L.M., Radmacher M.D., Freidlin B., Yu R., Li M.C., Simon R.** Methods for assessing reproducibility of clustering patterns observed in analyses of microarray data // Bioinformatics. — 2002. — Vol. 18, №11. — P. 1462–1469.
54. **Milligan G.W.** An examination of the effect of six types of error perturbation on fifteen clustering algorithms // Psychometrika. — 1980. — Vol. 45, №3. — P. 325–342.
55. **Milligan G.W., Cooper M.C.** An examination of procedures for determining the number of clusters in a data set // Psychometrika. — 1985. — Vol. 50, №2. — P. 159–179.
56. **Minsky M.L., Papert S.** Perceptrons. — Oxford, England: M.I.T. Press, 1969.
57. **Moore W.C., Meyers D.A., Wenzel S.E., Teague W.G., Li H., Li X., D'Agostino R.Jr., Castro M., Curran-Everett D., Fitzpatrick A.M., Gaston B., Jarjour N.N., Sorkness R., Calhoun W.J., Chung K.F., Comhair S.A., Dweik R.A., Israel E., Peters S.P., Busse W.W., Erzurum S.C., Bleeker E.R.** Identification of Asthma Phenotypes Using Cluster Analysis in the Severe Asthma Research Program // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. — 2009. — Vol. 181, №4. — P. 315–323.
58. **Phan P., Mezghani N., Wai E.K., de Guise J., Labelle H.** Artificial neural networks assessing adolescent idiopathic scoliosis: comparison with Lenke classification // The Spine Journal. — 2013.
59. **Pilcher C.D., Wong J.K., Pillai S.K.** Inferring HIV Transmission Dynamics from Phylogenetic Sequence Relationships // PLoS Medicine. — 2008. — Vol. 5, №3. — e69.
60. **Regard J.B., Sato I.T., Coughlin S.R.** Anatomical Profiling of G Protein-Coupled Receptor Expression // Cell. — 2008. — Vol. 135, №3. — P. 561–571.
61. **Rosenblatt F.** The perceptron: a probabilistic model for information storage and organization in the brain // Psychol. Rev. — 1958. — Vol. 65, №6. — P. 386–408.
62. **Rousseeuw P.J.** Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis // Journal of Computational and Applied Mathematics. — 1987. — Vol. 20. — P. 53–65.
63. **Rumelhart D.E., Hinton G.E., Williams R.J.** Learning representations by back-propagating errors // Nature. — 1986. — Vol. 323, №6088. — P. 533–536.
64. **Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O.** Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray // Science. — 1995. — Vol. 270, №5235. — P. 467–470.
65. **Shugai J., Guzhva A., Dolenko S., Persiantsev I.** An algorithm for construction of a hierarchical neural network complex for time series analysis and its application for studying sun-earth relations // 8th International Conference «Pattern Recognition and Image Analysis: New Information Technologies» (PRIA-8-2007): Conference Proceedings (Yoshkar-Ola). — 2007. — Vol. 2. — P. 355–358.
66. **Silver M.** Scales of Measurement and Cluster Analysis: An Application Concerning Market Segments in the Babyfood Market // The Statistician. — 1995. — Vol. 44, №1. — P. 101.
67. **Sneath P.H.** The application of computers to taxonomy // J. Gen. Microbiol. — 1957. — Vol. 17, №1. — P. 201–226.
68. **Sneath P.H.A.** Numerical taxonomy.
69. **Sokal R.R., Michener C.D.** A Statistical Method for Evaluating Systematic Relationships. — University of Kansas, 1958.
70. **Steinhaus H.** Sur la division des corps materiels en parties // Bull. Acad. Polon. Sci. — 1956. — Vol. III, №4. — P. 801–804.
71. **Stevens S.S.** On the Theory of Scales of Measurement // Science. 1946. — Vol. 103, №2684. — P. 677–680.
72. **Tan P.-N., Steinbach M., Kumar V.** Introduction to data mining. — Boston: Pearson Addison Wesley, 2005.
73. **Tavazoie S., Hughes J.D., Campbell M.J., Cho R.J., Church G.M.** Systematic determination of genetic network architecture // Nat. Genet. — 1999. — Vol. 22, №3. — P. 281–285.
74. **Tibshirani R., Walther G., Hastie T.** Estimating the number of clusters in a data set via the gap statistic // Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology). — 2001. — Vol. 63, №2. — P. 411–423.
75. **Ting Su, Dy J.** A deterministic method for initializing K-means clustering // IEEE Comput. Soc. — P. 784–786.
76. **Trion R.G.** Cluster analysis. — London: Ann Arbor Edwards Bros, 1939.

Поступила 12.10.13

Сведения об авторах:

Московцев Алексей Александрович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. тромбозиса и тромбогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН, доцент каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО «РМАПО» Минздрава РФ

Доленко Сергей Анатольевич, канд. физ.-мат. наук, старш. науч. сотр. отд. оперативного космического мониторинга НИИЯФ им. Д.В. Скобельцына

Савина Галина Дмитриевна, старш. преп. каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО «РМАПО» Минздрава РФ

М.В. Меситов, А.А. Московцев, А.А. Кубатиев

Молекулярная логика сигнальных путей при стрессе эндоплазматического ретикулума: система UPR (Unfolded Protein Response)

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

Эндоплазматический ретикулум — центральная органелла эукариотической клетки, обеспечивающая синтез и созревание большинства секреторных и трансмембранных белков. Интенсивность белкового синтеза и загрузка ЭПР созревающими белками неодинаковы в клетках разных типов и могут меняться в зависимости от клеточного микроокружения, физиологического состояния клетки, стадии клеточной дифференцировки. Качество созревающих трансмембранных и секреторных белков в ЭПР поддерживается с высокой точностью. Белки с ненативными конформациями, повторный фолдинг которых затруднен или энергетически невыгоден, подвергаются убиквитин-зависимой протеолитической деградации. Гомеостатический контроль созревания белков в ЭПР осуществляется системой взаимосвязанных сигнальных путей, представленных сенсорами, расположенными в люмене ЭПР, и эффекторами, передающими информацию в другие компартменты клетки. Эта система внутриклеточных сигнальных путей играет важную роль при стрессе эндоплазматического ретикулума и инициирует комплексную клеточную реакцию — ответ клетки на белки с ненативными конформациями (Unfolded Protein Response, UPR). Если гомеостаз клетки не может быть восстановлен, запускается клеточная гибель — адаптационный механизм надклеточного уровня, предохраняющий ткани и организм в целом от дисфункциональных и потенциально иммуногенных молекул секреторных и поверхностных белков. Нарушение функционирования UPR, а также связанной с ЭПР системы деградации белков, способствует возникновению и развитию многих заболеваний: сердечно-сосудистых, нейродегенеративных, эндокринных заболеваний, аутоиммунных процессов. Перечень факторов и задействованных механизмов при стрессе ЭПР постоянно пополняется, что является следствием значительного внимания исследователей к стрессу ЭПР как типовому молекулярно-патофизиологическому процессу, лежащему в основе многих заболеваний.

Ключевые слова: типовой молекулярно-патофизиологический процесс, эндоплазматический ретикулум, стресс ЭПР, убиквитин-зависимая деградация

M.V. Mesitov, A.A. Moskovtsev, A.A. Kubatiev

Molecular logic of the endoplasmic reticulum stress signal pathways: the system of Unfolded Protein Response

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

Endoplasmic reticulum (ER) is the central organelle of a eukaryotic cell, it provides the synthesis and maturation of the majority of secretory and transmembrane proteins. The intensity of ER-related protein synthesis and ER loading varies in different cell types and depends on the cell microenvironment, physiological state of the cells, the stage of cellular differentiation. Quality control of transmembrane and secretory proteins in ER is a high precision process. The proteins with non-native conformations which are difficult or energetically disadvantageous to refold undergo ubiquitin-dependent proteolytic degradation. Homeostatic control of protein maturation in ER is mediated by a system of interconnected signaling pathways represented sensors located in the lumen of the ER, and effectors, that transmit information to other cell compartments. This system of intracellular signaling pathways play an important role in the endoplasmic reticulum stress and initiates a complex cellular response to the proteins with non-native conformations (Unfolded Protein Response, UPR). However, if homeostasis is not restored, cell death is triggered via apoptosis, which is a supracellular level adaptation mechanism that protects the tissues and the whole organism from dysfunctional and potentially immunogenic unfolded proteins. Malfunctions of the UPR, as well as ER-associated protein degradation (ERAD) process contribute to the development of many diseases: cardiovascular, neurodegenerative, endocrine diseases, autoimmune. The list of factors and mechanisms involved in ER stress is constantly updated, which is a result of significant attention to ER stress as a typical pathophysiological process that forms the basis of many diseases.

Key words: typical molecular pathophysiological process, endoplasmic reticulum, ER stress, ubiquitin-dependent proteolytic degradation

Для корреспонденции: Меситов Михаил Валентинович, канд. биол. наук, старш. науч. сотр. лаб. регуляции репаративных процессов ФГБУ «НИИОПП РАМН». E-mail: michael.v.mesitov@gmail.com

Около 30% белков эукариот, в том числе большинство секреторных, синтезируется на рибосомах шероховатого эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и приобретает нативную конформацию в люмене эндоплазматического ретикулума [6]. Интенсивность белкового синтеза на полисомах, ассоциированных с мембраной ЭПР, и, соответственно, загрузка ЭПР созревающими белками, неодинакова в клетках разных типов и может меняться в зависимости от клеточного микроокружения, физиологического состояния клетки, стадии клеточной дифференцировки. Клетки эукариот способны адаптироваться к новым условиям посредством морфофункциональной перестройки эндоплазматического ретикулума и ассоциированных структур, включающих в себя аппарат белкового синтеза, систему окислительного фолдинга ЭПР. При этом фолдинговая емкость ЭПР, т.е. совокупность морфофункциональных свойств ЭПР, обеспечивающих конформационное созревание белков, приводится в соответствие объему синтезируемого белка.

Качество созревающих трансмембранных и секреторных белков поддерживается с высокой, даже избыточной точностью, что достигается высокой концентрацией в люмене ЭПР факторов, связывающих и выбраковывающих белки с ненативными конформациями. Система контроля качества белков в ЭПР ERQC (Endoplasmic Reticulum Quality Control) обеспечивает селективность их экспорта в комплекс Гольджи на основе «оценки нативности» белковых конформаций. При этом конечные мисфолдинговые формы, рефолдинг которых затруднен или энергетически невыгоден, система ERQC направляет по пути убиквитин-зависимой протеолитической деградации в цитоплазме.

Гомеостатический контроль в ЭПР осуществляется системой взаимосвязанных сигнальных путей с сенсорами, расположенными в люмене ЭПР, и эффекторами, передающими информацию в другие компартменты клетки. Эта система внутриклеточных сигнальных путей играет важную роль при стрессе эндоплазматического ретикулума и инициирует комплексную клеточную реакцию — ответ клетки на белки с ненативной конформациями (Unfolded Protein Response, UPR), включающий в себя ряд компенсаторных механизмов транскрипционного и посттранскрипционного уровней.

Можно выделить 3 ключевых элемента защитной стратегии клетки при стрессе ЭПР.

Во-первых, это запуск механизмов, приводящих к снижению нагрузки, оказываемой белоксинтезирующим аппаратом на ЭПР. Эта реакция является временной и осуществляется путем блокирования кеп-зависимой трансляции белков и их транслокации в ЭПР.

Вторым адаптационным механизмом является увеличение фолдинговой емкости ЭПР — в ходе этого процесса, требующего значительно больше времени для реализации, происходит, прежде всего, активация транскрипции генов системы фолдинга ЭПР, являющихся целевыми для UPR.

Если гомеостаз клетки не может быть восстановлен, инициируется клеточная гибель — третий адаптационный механизм надклеточного уровня, предохраняющий ткани и организм, в целом, от дисфункциональных и потенциально иммуногенных молекул секреторных и поверхностных белков.

UPR млекопитающих инициируется тремя трансмембранными сенсорами белков с ненативными конформациями в люмене ЭПР: IRE1, ATF6 и PERK [19, 26].

Сигнальный путь IRE1-XBP1

Трансмембранные белки-сенсоры ЭПР включают в себя:

- люменальную часть, принимающую сигналы о загруженности системы фолдинга ЭПР и наличии конформационно-незрелых белков;
- трансмембранный домен, закоренный в мембране ЭПР;
- цитоплазматическую эффекторную часть, взаимодействующую с транскрипционным или трансляционным аппаратами [26].

Механизм активации сенсора IRE1 (рис. 1) активно исследуется. IRE1 впервые был описан у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* как киназа с сайт-специфической эндорибонуклеазной активностью, которая при активации вырезала интрон из мРНК транскрипционного фактора HAC1. IRE1 представляет собой трансмембранный белок первого типа, локализующийся в ЭПР, и имеющий три домена: N-концевой люменальный, цитоплазматический киназный и цитоплазматический РНКазный домен, гомологичный РНКазе L [31, 37]. У млекопитающих идентифицированы два гомолога гена IRE1: IRE1 α , экспрессируемый в большинстве клеток и тканей, и IRE1 β , обнаруживаемый в эпителиальных клетках кишечника [41]. Накопление белков с ненативными конформациями в люмене ЭПР запускает олигомеризацию IRE1, вызывающую транс-аутофосфорилирование киназных доменов и последующую активацию РНКазных доменов IRE1 [16]. Предложено несколько моделей активации IRE1.

Согласно первой из них, сенсорная функция опосредуется шапероном ЭПР BiP, который выступает в качестве основного регулятора и в нормальных условиях находится в связанном состоянии с люменальным доменом IRE1, ингибируя олигомеризацию

последнего. При накоплении форм белков с ненативными конформациями, BiP диссоциирует с IRE1 вследствие образования комплексов с ними. Результатом диссоциации IRE1-BiP становится способность IRE1 к олигомеризации.

Вторая модель предполагает активацию IRE1 за счет непосредственного взаимодействия его люминального домена с белками, имеющими ненативные конформации.

Третья модель представляет собой комбинацию первых двух [19, 26].

На сегодняшний день наиболее вероятной моделью активации IRE1 для млекопитающих признается первая, согласно которой активность IRE1 в большей степени, или даже исключительно, зависит от диссоциации с BiP, нежели от непосредственного взаимодействия с белками, имеющими ненативные конформации. Однако, как было показано, у дрожжей IRE1 активируется посредством двухэтапного

механизма: диссоциации с BiP и непосредственного взаимодействия с белками с ненативными конформациями [24].

Активация IRE1 не влечет за собой каскада последовательно активируемых киназ, так как является единственным известным субстратом для себя самой. IRE1 — это бифункциональный фермент, обладающий как киназной, так и сайт-специфической эндорибонуклеазной активностью, регулируемой внутренним киназным модулем. Таким образом, белки семейства IRE1, активируя свою эндорибонуклеазную функцию, вырезают интроны из мРНК соответствующих транскрипционных факторов — функциональных гомологов: HAC1 у дрожжей и XBP1 у многоклеточных [26].

В своей структуре мРНК XBP1 имеет две частично перекрывающиеся консервативные открытые рамки считывания (ОРС), 26-нуклеотидный интрон и кодируемую первой рамкой доменную структуру

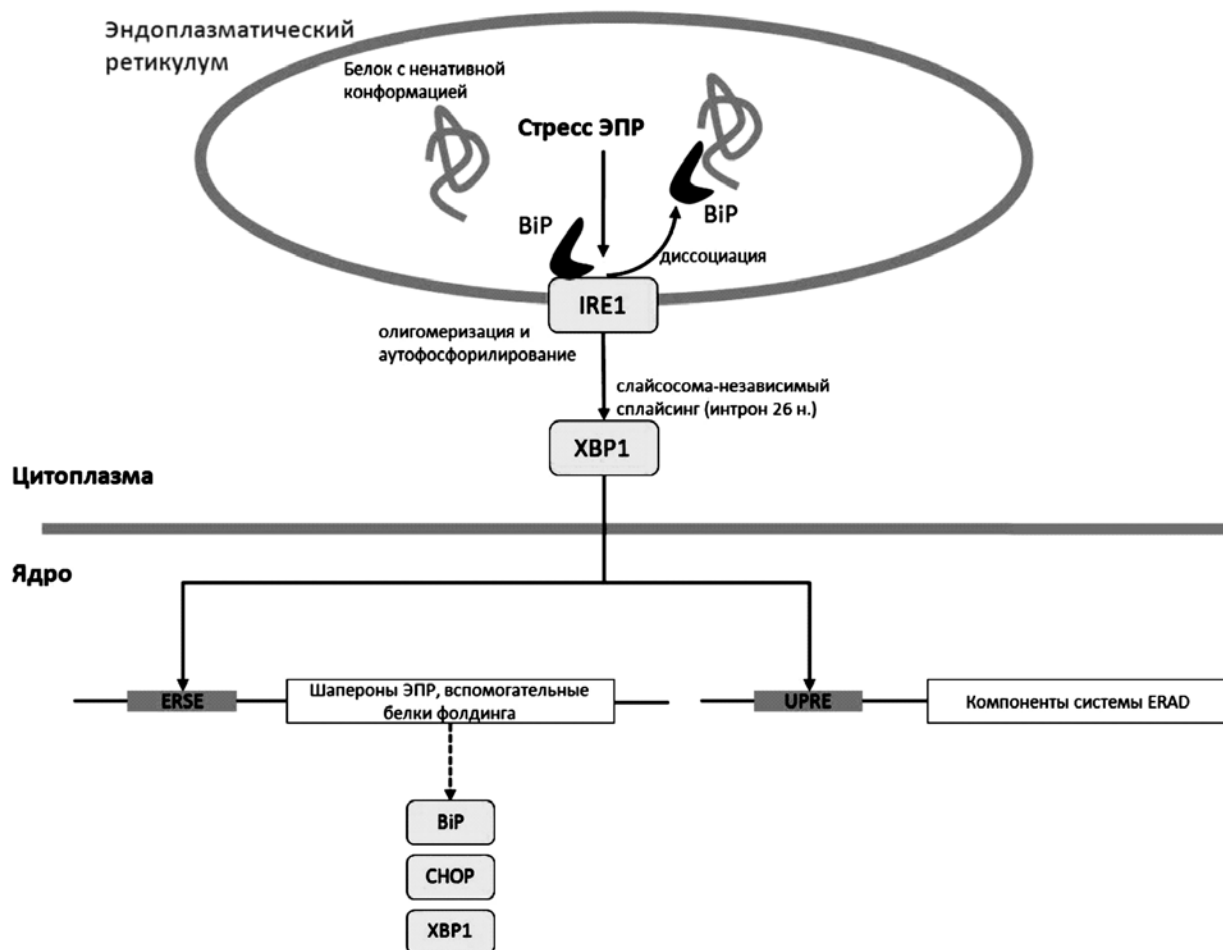


Рис. 1. Сигнальный путь IRE1-XBP1. IRE1-зависимый сплайсинг мРНК XBP1 приводит к синтезу активного транскрипционного фактора XBP1, который повышает уровень транскрипции генов шаперонов ЭПР, вспомогательных белков фолдинга, компонентов системы ЭПР-зависимой деградации белков, а также генов, вовлеченных в функционирование сигнальных каскадов UPR.

bZIP, расположенную в N-конце транслируемого полипептида (рис. 2). В ответ на стресс ЭПР экспрессия мРНК ХВР1 увеличивается, IRE1 α специфически распознает 5'- и 3'-сайты сплайсинга мРНК ХВР1, формирующие вторичные структуры мРНК типа «стебель — петля», и вырезает 26-нуклеотидный интрон, что приводит к сдвигу рамки считывания в позиции 165-й аминокислоты. При этом ДНК-связывающий домен, присутствующий в OPC1, соединяется с активационным доменом, находящимся в OPC2, в результате чего синтезируется активный транскрипционный фактор ХВР1 длиной 376 аминокислотных остатков. Однако даже в отсутствие стресса ЭПР интронсодержащая мРНК ХВР1 постоянно транслируется, хотя и на низком уровне, продуцируя полипептид длиной в 261 аминокислотный остаток, который быстро подвергается протеасомной деградации. Эта ситуация отлична от дрожжей, где интрон в составе мРНКНАС1 — функционального гомолога ХВР1 — блокирует собственную трансляцию.

По-видимому, трансляция мРНК ХВР1, не прошедшей цитоплазматический сплайсинг, может быть обусловлена тем, что 26-нуклеотидный интрон мРНК ХВР1 слишком короток, чтобы блокировать синтез, например, посредством образования вторичной структуры, препятствующей движению рибосомы. Промотор гена ХВР1 содержит дис-регуляторный элемент ERSE, консенсусная последовательность которого ССААТ-N9-ССАСG. Кроме ERSE-последовательностей, активный транскрипционный фактор ХВР1 распознает и связывается с другим типом регуляторных дис-элементов UPRE, имеющих последовательность TGACGTGG/A. Активная

форма транскрипционного фактора ATF6, которая подробно будет рассмотрена ниже, продуцируется в ответ на стресс ЭПР раньше, чем транскрипционный фактор ХВР1, по причине того, что ATF6 — результат посттрансляционного процессинга уже существующего белка-предшественника, тогда как белок ХВР1 должен *de novo* транслироваться с мРНК, которая к тому же еще должна пройти неклассический сплайсосома-независимый цитоплазматический сплайсинг, описанный выше. С другой стороны, ХВР1 может функционировать более длительное время, чем ATF6, так как поддерживает свою собственную транскрипцию при активной IRE1 благодаря наличию в промоторе ХВР1 элемента ERSE. Стоит заметить, что различные мутации, например SNP, в консервативных нуклеотидах сайтов сплайсинга мРНК ХВР1 могут приводить к нарушениям процесса вырезания интрона ферментом IRE1 [16, 42]. Фермент, осуществляющий лигирование мРНК ХВР1, у высших эукариот неизвестен, тем не менее, как и в случае с дрожжами, где в роли этого фермента выступает тРНК лигаза 1 (Trl1), процессинг и лигирование происходит в ассоциации с ЭПР [26].

Транскрипционный фактор ХВР1 содержит активационный домен и домен ядерной локализации, за счет которых он может запускать транскрипцию целевых генов в ядре. Однако было показано, что полипептид, транслирующийся с несплайсированной мРНК ХВР1, содержит вместо домена активации транскрипции домен «удаления» из ядра, и белок, таким образом, осциллирует между ядром и цитоплазмой. Несплайсированный ХВР1 способен образовывать комплекс с активным ХВР1 и тем самым способствовать удалению последнего из ядра и быстрой

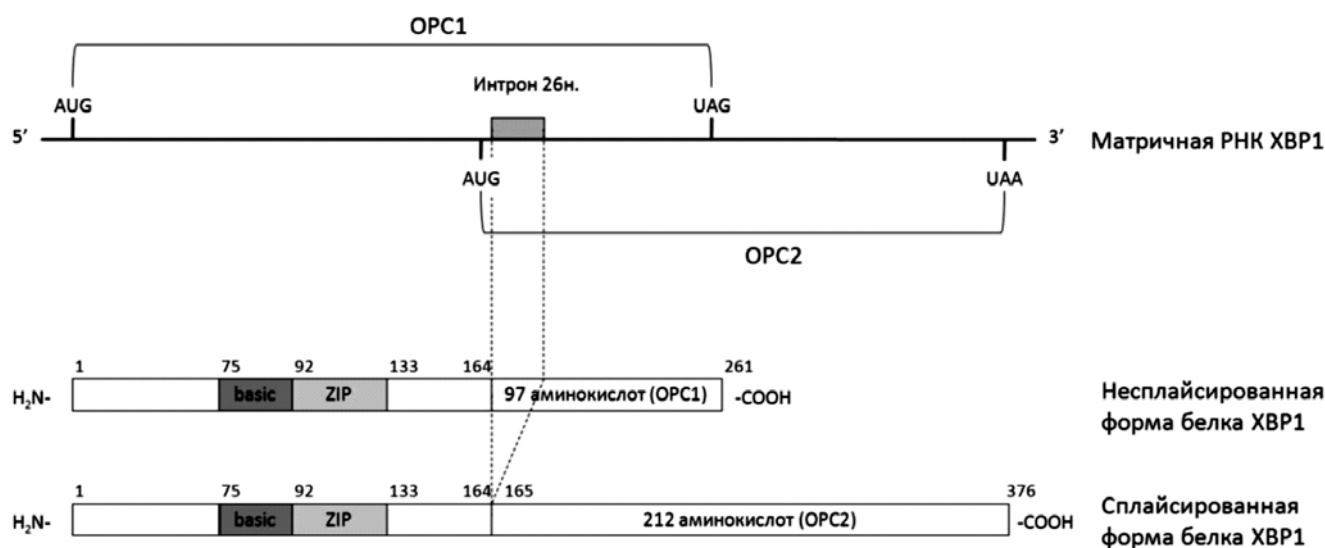


Рис. 2. Схематическое представление несплайсированной и сплайсированной форм мРНК ХВР1. basic и ZIP — участки мРНК, кодирующие соответствующие домены белковой молекулы.

деградации в протеасомах. Таким образом, белок, кодируемый несплайсированной формой мРНК ХВР1, является обратным регулятором активного транскрипционного фактора ХВР1 и может, таким образом, ингибировать транскрипцию целевых генов последнего в восстановительной фазе стресса ЭПР [43].

ХВР1 повышает уровень транскрипции генов шаперонов ЭПР, вспомогательных белков фолдинга, компонентов системы ЭПР-зависимой деградации белков, а также генов, вовлеченных в функционирование сигнальных каскадов UPR [15, 17, 19].

Как известно, процесс дифференцировки В лимфоцитов в активно секретирующие антитела плазматические клетки сопровождается существенным увеличением биосинтеза иммуноглобулинов, для чего необходимо увеличение фолдинговой емкости ЭПР. Повышение эффективности биосинтеза и секреции антител происходит за счет активации элементов системы UPR, в частности, сигнального каскада IRE1-ХВР1, контролирующего широкий спектр генов секреторного пути [7, 25, 27]. Это влечет за собой увеличение размеров клетки, числа лизосом, митохондрий, рибосом, повышение активности митохондрий, рост общего синтеза белка, что и придает плазмочиту характерный фенотип секреторной клетки [27]. Участие системы UPR в процессе дифференцировки В лимфоцитов в плазматические клетки свидетельствует о значимости ЭПР-адаптационных процессов в гуморальном иммунитете [7]. В частности, функционирование сигнального пути IRE1—ХВР1 критически важно для раннего лимфоцитопозеза на этапе про-В-клеток, а также на поздней стадии В-клеточного лимфоцитопозеза- IRE1-опосредованный сплайсинг мРНК ХВР1, таким образом, принадлежит к числу ключевых механизмов конечной дифференцировки В-клеток в плазматические клетки [44]. В ряде случаев В-клеточной лимфомы в гене ХВР1 была идентифицирована мутация — однонуклеотидная замена (277G>A) в экзоне 1, приводящая к соматической миссенс-мутации (R76K) [36].

Последние исследования по «узнаванию» ферментом IRE1 структур РНК типа «стебель — петля» показали, что кроме классического субстрата мРНК ХВР1, IRE1 может специфически расщеплять соответствующую вторичную антикодоновую структуру немодифицированной транспортной РНК фенилаланина. IRE1 имеет пока единственный предполагаемый гомолог — РНКазу L (RNaseL). Димеризация и последующая олигомеризация IRE1 приводит к активации РНКазной функции и формированию активного сайта распознавания и расщепления соответствующих вторичных структур РНК [14].

В результате анализа совокупности мРНК, экспрессируемой клетками *Drosophila melanogaster* в со-

стоянии стресса ЭПР, был открыт процесс IRE1-зависимой деградации мРНК, ассоциированных с ЭПР [12]. Этот процесс, возможно, представляет собой ХВР1-независимый посттранскрипционный механизм контроля ферментом IRE1 экспрессии генов в клетках, находящихся в состоянии стресса ЭПР [26].

Сигнальный путь ATF6

Поиск новых транскрипционных факторов, взаимодействующих с энхансерными элементами, представленными в промоторах генов системы UPR, привел к открытию нового важного звена в механизме клеточного ответа на стресс ЭПР — фактора активации транскрипции 6, ATF6 [11]. В данную группу энхансерных элементов входит мотив ERSE, который специфически распознается ДНК-связывающим доменом ATF6 (имеющим сходство с таковым у дрожжевого транскрипционного фактора Hac1p), вследствие чего происходит активация транскрипции целевых генов [41].

ATF6 — трансмембранный гликопротеин второго типа, состоящий из трех доменов:

- сенсорного (С-конец), обращенного в люмен и детектирующего конформационно-дефектные белки;
- центрального гидрофобного участка, заякоренного в мембране ЭПР;
- N-концевого цитоплазматического.

ATF6 синтезируется как предшественник, имеющий молекулярную массу 90 кДа [11]. В ответ на стресс ЭПР, ATF6 перемещается из ЭПР в комплекс Гольджи, где расщепляется сначала протеазой сайта 1 (S1P), а затем протеазой сайта 2 (S2P) [40]. Его транспорт происходит в везикулах, покрытых белком COPII [20, 32]. В результате протеолитического расщепления ATF6 образуется цитоплазматический фрагмент массой 50 кДа, являющийся активным транскрипционным фактором, содержащим домен bZIP [40]. Последний перемещается в ядро, где он посредством связывания с мотивом ERSE и взаимодействия с основным транскрипционным фактором NF- Υ активирует транскрипцию генов шаперонов ЭПР, таких, как BiP, вспомогательных белков фолдинга и генов-участников UPR, включая ХВР1 и СНОР (рис. 3) [11, 17].

Механизмы регулируемого внутримембранного протеолиза белка ATF6 являются общими с белками семейства SREBP, которые также процессируются в ответ на дефицит холестерина и активируют синтез холестерина и жирных кислот, а также их захват из липопротеидов плазмы. В обоих случаях, несмотря на различие в инициаторных сигналах, активация этих транскрипционных факторов происходит путем пере-

мещения неактивного предшественника в аппарат Гольджи с последующим его протеолизом [26, 40]. Однако процессинг ATF6 не требует белка SCAP, который образует комплексы с белками SREBPs и сопровождает их в комплекс Гольджи. Таким образом, протеазы S1P и S2P необходимы как для ответа на стресс ЭПР, так и для индукции синтеза липидов [40].

Механизм активации ATF6 в ответ на стресс ЭПР остается по-прежнему дискуссионным. Предположительно, это может быть непосредственное распознавание форм белков с ненативными конформациями или шаперон-опосредованный путь [26]. Согласно последней, «конкурентной» гипотезе, шаперон BiP в нормальных условиях связан с люменальным доменом ATF6 и поддерживает его в неактивном состоянии, за счет маскирования GLS — сигналов локализации комплекса Гольджи. Это блокирует транспорт и активацию ATF6 в Гольджи и, в отсут-

ствии активного ATF6, транскрипция шаперонов ЭПР поддерживается на сравнительно низком уровне. Следует подчеркнуть, что в отличие от динамического взаимодействия шаперонов с субстратом, образующаяся связь между BiP и ATF6 более стабильна. Она обусловлена пептид-связывающим доменом BiP (который распознает ATF6 как белок с ненативной конформацией), претерпевающим АТФ-зависимые конформационные изменения, в результате которых быстро диссоциирующий комплекс BiP (АТФ-связанный) с субстратом замещается слабо диссоциирующим АДФ-связанным комплексом, в этом процессе не исключена роль кошаперонов. При накоплении в люмене ЭПР форм белков с ненативными конформациями, BiP связывается с ними, предотвращая агрегацию и способствуя их фолдингу, при этом дефицит BiP приводит к его диссоциации с люменальным доменом ATF6, к демаскированию GLSs и перемещению ATF6 в комплекс Гольджи, где и происходит

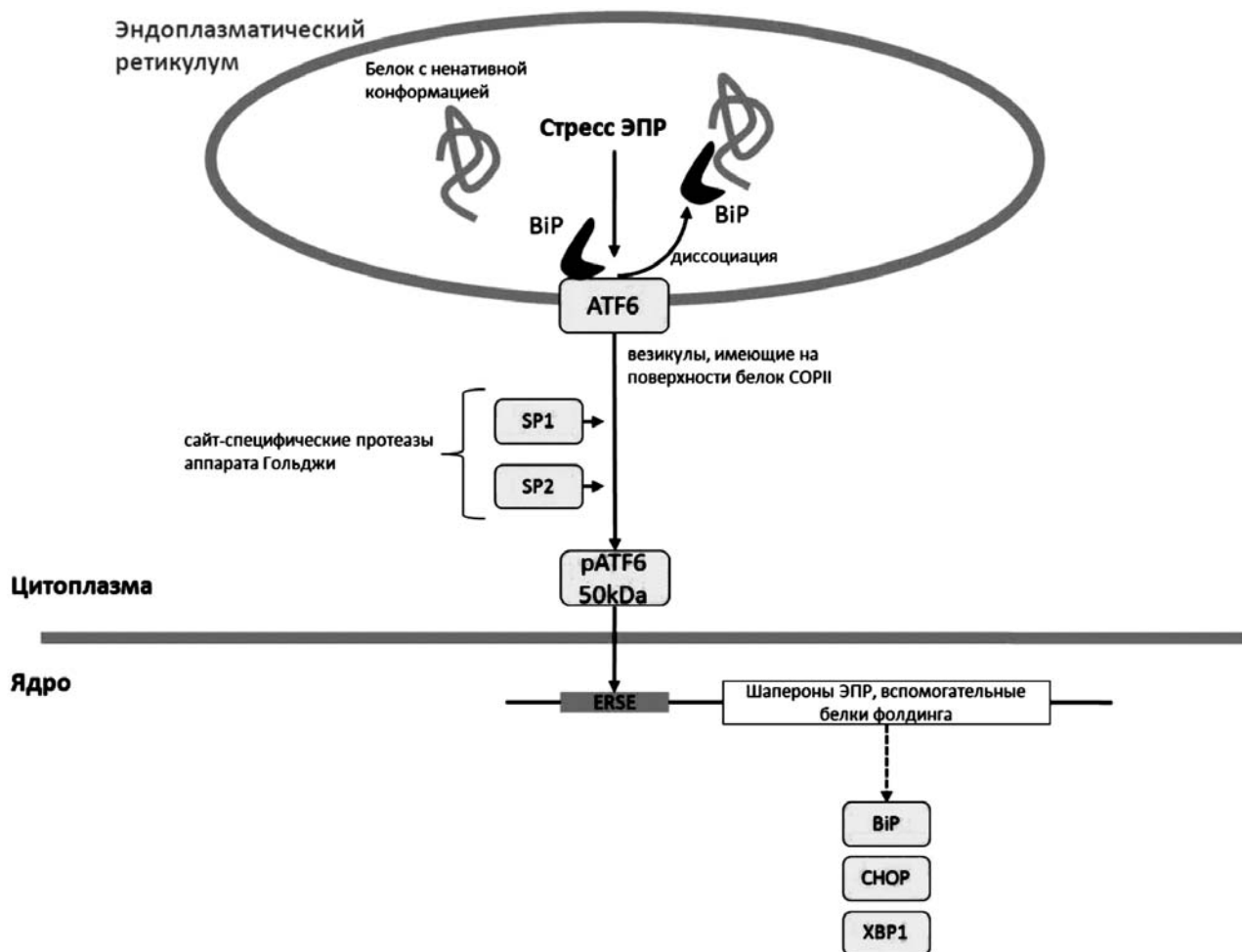


Рис. 3. Сигнальный путь ATF6. Процессированный транскрипционный фактор ATF6 активирует транскрипцию генов шаперонов ЭПР, вспомогательных белков фолдинга, а также компонентов системы UPR.

протеолитическая активация протеазами S1P и S2P. Процессированный транскрипционный фактор ATF6 увеличивает транскрипцию генов шаперонов ЭПР и вспомогательных белков фолдинга, что способствует компенсации стресса ЭПР. Если клетке удастся восстановить гомеостаз, вновь синтезированный ATF6 связывается с избытком BiP и становится неактивным, в результате чего экспрессия шаперонов ЭПР постепенно снижается. Было установлено [29], что высокомолекулярный комплекс ATF6-BiP свободно перемещается в плоскости мембраны ЭПР, но в нестрессированных условиях не покидает ЭПР. Это может быть обусловлено маскированием BiPGLSs, вследствие чего ATF6 не может быть распознан компонентами транспортной системы ЭПР-комплекс Гольджи. С другой стороны, комплекс ATF6-BiP может быть слишком велик для включения в везикулы anterogradного транспорта [28, 29].

Вследствие присутствия внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей, формирующихся между двумя консервативными остатками цистеина люменального домена, ATF6, в нормальных условиях, присутствует в мембране ЭПР в виде окисленных мономеров, димеров или олигомеров. При развитии стресса ЭПР, ATF6 восстанавливается, и в виде восстановленных мономеров транспортируется в комплекс Гольджи. Было показано [20], что именно восстановленные мономерные формы могут достигать комплекса Гольджи и процессироваться там, тогда как окисленные формы ATF6 гораздо менее чувствительны к протеазе S1P. Но, несмотря на это, само по себе восстановление не является необходимым условием активации ATF6. Следует отметить разницу в механизмах рецепции стресса ЭПР сенсорами IRE1, PERK (будет рассмотрена ниже) и ATF6: PERK и IRE1, олигомеризуются при активации, тогда как ATF6, наоборот, диссоциирует до восстановленных мономеров. Это обстоятельство может быть причиной отличий в кинетике ответа IRE1, PERK и ATF6 на действия различных индукторов стресса ЭПР. Таким образом, клетка может дифференциально активировать одно или два плеча системы UPR, вместо постоянной активации всех трех, что может обеспечить более мягкое, «физиологическое» протекание стресса ЭПР [20].

Полупериод жизни 90 кДа и 50 кДа форм ATF6 в клетках HeLa составляет приблизительно 2 ч. Такая высокая скорость обновления позволяет клеткам восстанавливать 90 кДа форму ATF6 через 16 ч [11] после обработки тапсигаргином или туникамицином, хотя в последнем случае он не гликозилирован [11, 16].

ATF6 и XBP1 усиливают транскрипцию генов шаперонов ЭПР, вспомогательных белков фолдинга,

компонентов UPR и системы белковой деградации, ассоциированной с ЭПР (ERAD), а также ферментов, участвующих в биосинтезе фосфолипидов, чтобы повысить эффективность фолдинга и скорость деградации белков с нарушенной конформацией, а также увеличить размеры компартмента ЭПР, что, в целом, является сравнительно долгосрочной адаптацией клеток к стрессу ЭПР [3, 19, 26].

Сигнальный путь PERK-ATF4

В клетках млекопитающих обнаружено несколько киназ, фосфорилирующих остаток серина в положении 51 α -субъединицы эукариотического инициаторного фактора 2, eIF2 α , в ответ на специфические стрессовые сигналы, что ингибирует инициацию трансляции и, следовательно, синтез белков. Кроме регуляции интенсивности белкового синтеза, eIF2 α -киназы млекопитающих принимают участие в регуляции стресс-индуцированной экспрессии генов на транскрипционном уровне. К eIF2 α -киназам относятся:

- PERK, которая активируется белками с нарушенной конформацией в люмене ЭПР и снижает синтез белка и загрузку системы фолдинга ЭПР [9, 30, 39];
- PKR, активируемая двухцепочечной РНК и аттенуирующая трансляцию белоксинтезирующим аппаратом клетки-хозяина при вирусной инфекции;
- HRI, которая при активации снижает синтез белка в дефицитных по гемму предшественниках эритроцитов, приводя в соответствие синтез гемоглобина с доступностью железа;
- GCN2, активация которой «ненагруженными», свободными тРНК при дефиците питательных веществ сохраняет аминокислоты для их использования в основных метаболических путях [8, 39].

PERK представляет собой трансмембранный белок ЭПР, состоящий из трех доменов: люменального — сенсорного, трансмембранного и цитоплазматического — киназного. В нормальных условиях люменальный домен PERK связан с шапероном BiP, который ингибирует ее активацию. При стрессе ЭПР происходит диссоциация шаперона, который связывает белки с нарушенной конформацией, от люменального домена PERK, что приводит к олигомеризации, аутофосфорилированию и, как следствие, активации киназы [18, 34]. Активированная PERK, как уже было сказано, фосфорилирует eIF2 α , что приводит к блокированию общего, кеп-зависимого, синтеза белка (рис. 4). Установлено, что PERK экспрессируется во всех исследованных тканях человека, с наибольшим уровнем в клетках, специализирующихся на секреции полипептидов [35].

Следствием аттенуации белкового синтеза может также стать арест клеточного цикла. Так, на фибробластах 3T3 было показано, что гиперэкспрессия PERK в нормальных условиях ингибирует синтез циклина D1, приводя к аресту клеточного цикла в фазе G1. Этот факт указывает на связь стресса ЭПР и контроля клеточного цикла [1].

Итак, основной функцией киназы PERK является снижение трансляции в ответ на стресс ЭПР, что в физиологическом контексте является кратковременным адаптивным ответом [9]. Кроме этого, PERK принимает участие в защите клеток от окислительного стресса, вызванного стрессом ЭПР. Нарушение функционирования сигнального пути PERK — ATF4 ведёт к росту уровня АФК, а также к нарушению внутриклеточного метаболизма аминокислот, включая цистеин. Последний является основой функционирования внутриклеточных тиолсодержащих пептидов и белков, вовлеченных в окислительно-восстановительные реакции. Было предположено, что PERK-зависимая активация ATF4 (см. ниже) и следующая за ним последовательная экспрессия генов являются физиологической адаптацией на окислительный стресс, который может быть ассоциирован с высоким уровнем биосинтеза и котрансляционного окислительного фолдинга секреторных белков [10].

Однако аттенуации трансляции не абсолютна. Фосфорилирование eIF2 α активирует трансляцию ряда мРНК, имеющих несколько коротких открытых рамок считывания (ОРС) и расположенных до последовательности, кодирующей основной продукт. Так происходит с мРНК транскрипционного фактора ATF4, транслированный продукт которой активирует экспрессию генов, участвующих в метаболизме аминокислот, окислительно-восстановительном балансе, апоптозе и системе ЭПР-ассоциированной деградации белков [13, 33, 34, 39].

ОРС в 5'-нетранслируемой области мРНК ATF4 консервативны у различных организмов в диапазоне от беспозвоночных до млекопитающих. Стресса ЭПР, а также депривация аминокислот приводят к росту уровня белка ATF4. Так, на клетках W4 ES (мышинные эмбриональные стволовые клетки) экспериментально было показано, что в течение 20 мин после индукции стресса ЭПР тапсигаргином (токсин, ингибирующий N-гликозилирование белков) активировалась трансляция мРНК ATF4. В течение стресса экспрессия ATF4 регулируется посттранскрипционно. Следует заметить, что не все мРНК с ОРС регулируются однотипно. Например, мРНК NFE2L1, имеющая несколько ОРС, активно транслируется в клетках в нор-

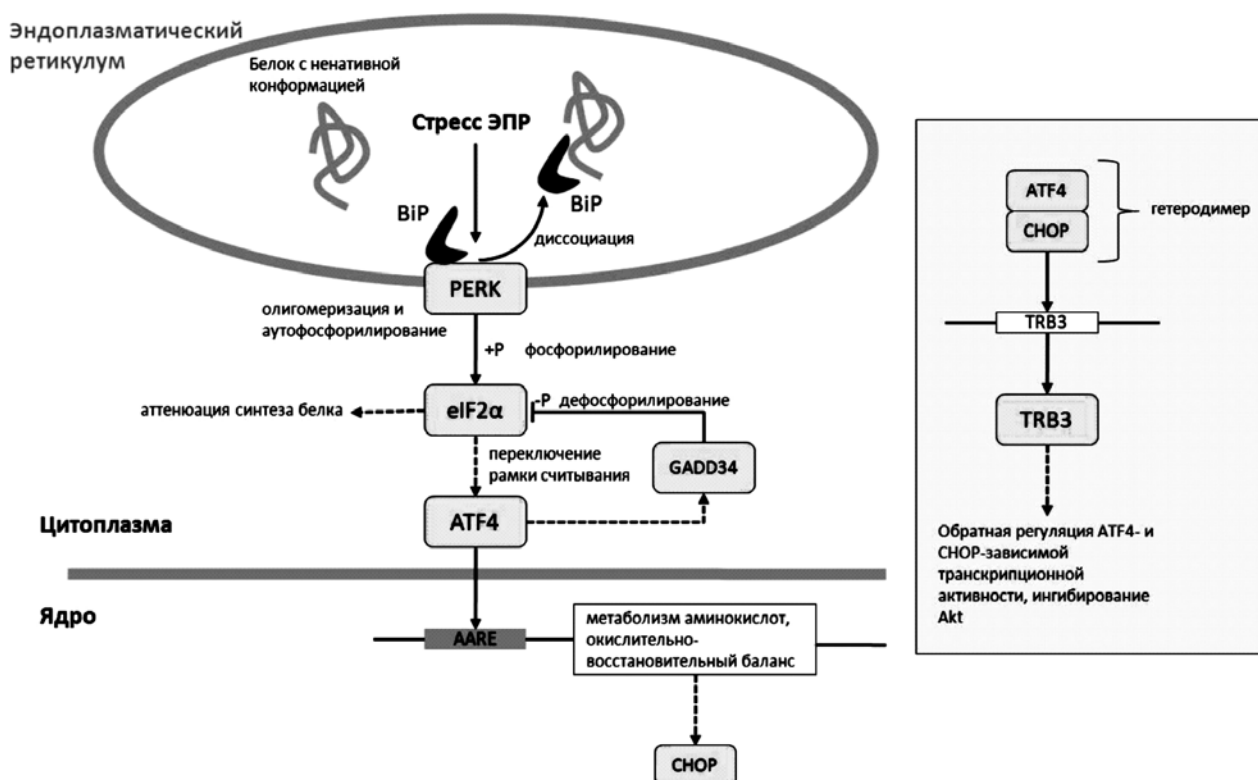


Рис. 4. Сигнальный путь PERK-ATF4 и его обратная регуляция. Активация сигнального пути PERK-ATF4 приводит к аттенуации трансляции и увеличению экспрессии транскрипционного фактора CHOP. Гетеродимер ATF4-CHOP активирует транскрипцию TRB3, выполняющего роль обратного регулятора ATF4-CHOP-зависимой транскрипционной активности.

мальном состоянии и снижает свою трансляцию при стрессе [8]. Кроме того, ATF4 димеризуется с транскрипционным фактором NRF-2, который индуцирует экспрессию Hmx-1 и способствует устойчивости к окислительному стрессу [10].

5' проксимальная OPC1 — регуляторный элемент, способствующий прохождению рибосом и повторной инициации трансляции в расположенном ниже кодирующем регионе мРНК ATF4 (рис. 5). В нормальном состоянии в клетке комплекс eIF2-ГТФ-Мет-тРНК_{инициаторная} находится в избыточном количестве и доступен для рибосом, что позволяет им проходить OPC1 и повторно иницировать трансляцию в следующем кодирующем регионе на OPC2, которая является ингибиторным регуляторным элементом, блокирующим дальнейшую трансляцию мРНК. В течение стресса ЭПР фосфорилирование eIF2 α , сопровождающееся снижением уровня eIF2-ГТФ, увеличивает время, необходимое рибосомам, чтобы повторно инициировать трансляцию. Такая задержка повторной инициации позволя-

ет рибосомам пройти через ингибиторную OPC2 и начать трансляцию на OPC3 в кодирующем регионе ATF4 [38].

Значимость PERK-опосредованного сигнального пути для нормального роста и развития организма была показана на мышцах, несущих мутацию, приводящую к дисфункции PERK. Такие мышцы демонстрировали существенное, но сбалансированное отставание в росте в течение первых нескольких дней постнатального развития. Также отмечалось нарушение продукции инсулина β -клетками поджелудочной железы, что приводило к раннему развитию инсулинозависимого диабета. Эти, а также некоторые другие характерные клинические проявления, включая эпифизарную дисплазию, остеопороз, печеночную и почечную недостаточность, расстройство экзокринной функции поджелудочной железы и нейтропению, встречаются у человека при синдроме Уолкотта—Раллисона — аутосомно-рецессивном заболевании, развивающемся вследствие нонсенс- или миссенс-мутации в гене PERK [39].

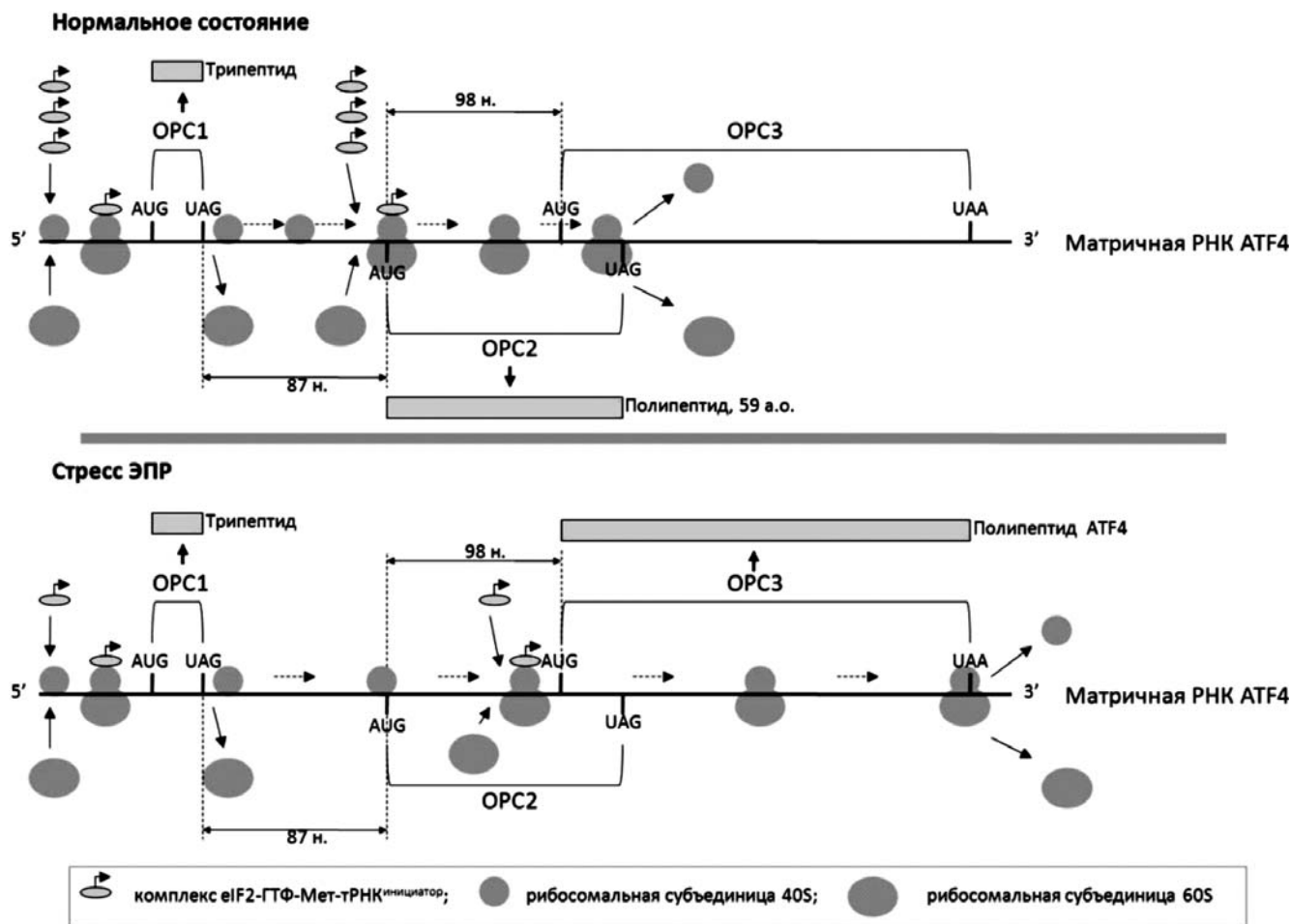


Рис. 5. Схематическое представление переключения рамки считывания мРНК ATF4 при стрессе ЭПР

Транскрипционный фактор CHOP

CHOP играет важную роль в регуляции и развитии программированной клеточной гибели и регенерации. Он относится к семейству транскрипционных факторов C/EBP. Первоначально CHOP был описан как ген, индуцируемый повреждением ДНК, в более поздних работах была зафиксирована его активация при стрессе ЭПР. ЭПР-стресс-ассоциированный белок CHOP вызывал арест клеточного цикла и апоптоз [22, 23]. Транскрипционный фактор CHOP представляет собой модульный белок, состоящий из активационного домена, ДНК-связывающего основного региона и богатого лейцином домена димеризации, два последних условно объединены в доменную структуру bZIP. Димеризационный домен, называемый «лейциновой застёжкой», — группа из семи остатков лейцина, которые взаимодействуют с остатками лейцина димеризационного партнёра и связывают две α -спирали, расположенные параллельно, но в противоположной ориентации. Димеризация является необходимым предварительным условием для связывания с ДНК. Домены, ответственные за активацию и/или подавление транскрипции располагаются в N-концевой области белка. CHOP — ядерный транскрипционный фактор, являющийся ингибитором семейства транскрипционных факторов C/EBP и ряда других, механизм действия которого состоит в формировании стабильных гетеродимеров, которые оказываются неспособными к связыванию с распознаваемыми ими цис-элементами ДНК. Это происходит из-за наличия двух остатков пролина в ДНК-связывающем регионе, которые нарушают спиральную структуру последнего, что предотвращает связывание гетеродимера с классическим C/EBP-энхансерным элементом ДНК. CHOP имеет высокую степень гомологии с C/EBP-подобными белками в C-концевом регионе, содержащем bZIP. В состав C-концевого региона входит сигнал ядерной локализации. Накапливающийся в течение стресса ЭПР белок CHOP разрушается посредством убиквитин-протеасомной системы, благодаря особому мотиву N-концевого региона. Этот мотив содержит спиральную структуру, необходимую, возможно, для связывания с E3-убиквитинлигазой, которая добавляет убиквитин к остаткам лизина белковой молекулы, подлежащей деградации. Также N-концевой регион CHOP необходим для транскрипционной активности и взаимодействия с коактиваторами [23].

В промоторе CHOP были идентифицированы цис-регуляторные элементы: мотив AARE и два мотива ERSE. Установлено, что при ответе на стресс белки TRB3 и ATF4, присутствующие в едином комплексе, специфически связываются с цис-регуляторными элементами в промоторе CHOP (AARE) и ингибируют

его транскрипцию [13]. Также с последовательностью AARE связываются ATF4, ATF2 и C/EBP β [4]. Кроме стресса ЭПР, ген CHOP активируется другими стресс-индуцирующими стимулами, такими, как арсеныты и депривация аминокислот, которые также запускают фосфорилирование eIF2 α . ATF4 играет роль активатора промотора CHOP [8].

Обратная регуляция сигнального пути PERK-ATF4

Фосфорилирование остатка серина в положении 51 α -субъединицы eIF2 влечет за собой двойной эффект: аттенуацию общей трансляции белков и активацию экспрессии генов, вовлеченных в ответ на стресс ЭПР, таких, как ATF4, CHOP, BiP и др. Было обнаружено, что белок GADD34 ослабляет экспрессию гена CHOP, активированную в ответ на стресс ЭПР и депривацию аминокислот. Экспрессия GADD34 коррелирует с развитием стресса, и белок отсутствует в клетках с нарушенным функционированием eIF2 α -киназ. Таким образом, GADD34-зависимое дефосфорилирование eIF2 α формирует отрицательную обратную связь, которая ингибирует экспрессию генов, вовлеченных в ответ на стресс, и способствует установлению его восстановительной фазы (рис. 4) [21]. Экспрессия гена GADD34 в клетках млекопитающих и человека активируется при аресте клеточного цикла, повреждениях ДНК, а также при других формах клеточного стресса. GADD34 связывается с каталитической α -субъединицей серин/треонинпротеинфосфатазы 1, PP1. Комплекс GADD34-PP1 регулирует дефосфорилирование eIF2 α и, тем самым, уровень трансляции белков [5]. Так, было показано, что экспрессия GADD34 в эпителиоподобных клетках линии человека (HEK 293) приводила к дефосфорилированию eIF2 α , которая находилась в фосфорилированном состоянии вследствие активации системы UPR туникамицином и тапсигарином — классическими индукторами стресса ЭПР [2].

Перечень факторов и задействованных механизмов при стрессе ЭПР постоянно пополняется, что является следствием значительного внимания исследователей к стрессу ЭПР как типовому молекулярно-патолофизиологическому процессу, лежащему в основе многих заболеваний. Система UPR — не только компонент стрессового ответа клеток, но и важный физиологический адаптивный элемент профессиональных секреторных клеток. При интенсификации продукции белка система конформационного созревания белков ЭПР генерирует большее количество ошибок, приводящих к образованию белков с дефектными конформациями. Кроме того, меняющиеся потребности организма в секретируемом белке инду-

цируют адаптации клеток к новому уровню синтеза и фолдинга белка в ЭПР. Система UPR вовлекается в регуляцию различных физиологических процессов, например, дифференцировку клеток. Соответственно, нарушение функционирования UPR, а также связанной с ЭПР системы деградации белков, способствует возникновению и развитию многих заболеваний. Стресс ЭПР вовлечен в развитие сердечно-сосудистых, нейродегенеративных, эндокринных заболеваний, аутоиммунных процессов. Так, в основе патогенеза ряда нейродегенеративных заболеваний лежит дисфункция протеасом, приводящая к накоплению агрегатов белков с дефектной конформацией в ядре и цитоплазме нейронов. Несмотря на то, что функционирование ЭПР напрямую не нарушается, в некоторых случаях это приводит к продолжительной активации UPR и, как следствие, гибели клетки. Персистирующий стресс ЭПР также вовлечен в патогенез диабета. Длительная активация UPR, связанная с устойчивостью к инсулину, может индуцировать гибель β -клеток поджелудочной железы.

Список литературы

1. **Brewer J.W., Diehl J.A.** PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response // *PNAS*. — 2000. — Vol. 97, №23. — P. 12625—12630.
2. **Brush M.H., Weiser D.C., Shenolikar S.** Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein GADD34 Targets Protein Phosphatase 1 to the Endoplasmic Reticulum and Promotes Dephosphorylation of the Subunit of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 // *Molecular and Cellular Biology*. — 2003. — Vol. 23, №4. — P. 1292—1303.
3. **Bommasamy H., Back S.H., Fagone P., Lee K., Meshinchi S., Vink E., Sriburi R., Frank M., Jackowski S., Kaufman R.J., Brewer J.W.** ATF6 α induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum // *Journal of Cell Science*. — 2009. — Vol. 122. — P. 1626—1636.
4. **Carraro V., Maurin A.-C., Lambert-Langlais S., Averous J., Chaveroux C., Parry L., Jousse C., Ord D., Ord T., Fafournoux P., Bruhat A.** Amino Acid Availability Controls TRB3 Transcription in Liver through the GCN2/eIF2 α /ATF4 Pathway // *PLoS ONE*. — 2010. — Vol. 5, №12.
5. **Connor J.H., Weiser D.C., Li S., Hallenbeck J.M., Shenolikar S.** Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein GADD34 Assembles a Novel Signaling Complex Containing Protein Phosphatase 1 and Inhibitor 1 // *Molecular and Cellular Biology*. — 2001. — Vol. 21, №20. — P. 6841—6850.
6. **Ellgaard L., Molinari M., Helenius A.** Setting the Standards: Quality Control in the Secretory Pathway // *Science*. — 1999. — Vol. 286. — P. 1882—1888.
7. **Gunn K.E., Gifford N.M., Mori K., Brewer J.W.** A role for the unfolded protein response in optimizing antibody secretion // *Mol. Immunol.* — 2004. — Vol. 41, №9. — P. 919—927.
8. **Harding H. P., Novoa I., Zhang Y., Zeng H., Wek R., Schapira M., Ron D.** Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells // *Molecular Cell*. — 2000. — Vol. 6. — P. 1099—1108.
9. **Harding H.P., Zhang Y., Bertolotti A., Zeng H., Ron D.** Perk Is Essential for Translational Regulation and Cell Survival during the Unfolded Protein Response // *Molecular Cell*. — 2000. — Vol. 5. — P. 897—904.
10. **Harding H.P., Zhang Y., Zeng H., Novoa I., Lu P.D., Calfon M., Sadri N., Yun C., Popko B., Paules R., Stojdl D.F., Bell J.C., Hettmann T., Leiden J.M., Ron D.** An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress // *Molecular Cell*. — 2003. — Vol. 11. — P. 619—633.
11. **Haze K., Yoshida H., Yanagi H., Yura T., Mori K.** Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress // *Molecular Biology of the Cell*. — 1999. — Vol. 10. — P. 3787—3799.
12. **Hollien J., Weissman J.S.** Decay of Endoplasmic Reticulum-Localized mRNAs During the Unfolded Protein Response // *Science*. — 2006. — Vol. 313. — P. 104—107.
13. **Jousse C., Deval C., Maurin A.-C., Parry L., Cherasse Y., Chaveroux C., Lefloch R., Lenormand P., Bruhat A., Fafournoux P.** TRB3 Inhibits the Transcriptional Activation of Stress-regulated Genes by a Negative Feedback on the ATF4 Pathway // *The Journal of Biological Chemistry*. — 2007. — Vol. 282, №21. — P. 15851—15861.
14. **Korennykh A.V., Korostelev A.A., Egea P.F., Finer-Moore J., Stroud R.M., Zhang C., Shokat K.M., Walter P.** Structural and functional basis for RNA cleavage by Ire1 // *BMC Biology*. — 2011. — Vol. 9. — P. 47.
15. **Lee A.-H., Iwakoshi N.N., Glimcher L.H.** XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response // *Mol. Cell Biol.* — 2003. — Vol. 21. — P. 7448—7459.
16. **Lee K., Tirasophon W., Shen X., Michalak M., Prywes R., Okada T., Yoshida H., Mori K., Kaufman R.J.** IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response // *Genes and Development*. — 2002. — Vol. 16. — P. 452—466.
17. **Li X., Zhang K., Li Z.** Unfolded protein response in cancer: the Physician's perspective // *Journal of Hematology and Oncology*. — 2011. — Vol. 4, №8. — P. 1—10.
18. **Ma K., Vatter K.M., Wek R.C.** Dimerization and Release of Molecular Chaperone Inhibition Facilitate Activation of Eukaryotic Initiation Factor-2 Kinase in Response to Endoplasmic Reticulum Stress // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277, №21. — P. 18728—18735.
19. **Merksamer P.I., Papa F.R.** The UPR and cell fate at a glance // *Journal of Cell Science*. — 2010. — Vol. 1. — P. 1003—1006.
20. **Nadanaka S., Okada T., Yoshida H., Mori K.** Role of Disulfide Bridges Formed in the Luminal Domain of ATF6 in Sensing Endoplasmic Reticulum Stress // *Mol. Cell Biol.* — 2007. — Vol. 27, №3. — P. 1027—1043.
21. **Novoa I., Zeng H., Harding H.P., Ron D.** Feedback Inhibition of the Unfolded Protein Response by GADD34-mediated Dephosphorylation of eIF2 α // *The Journal of Cell Biology*. — 2001. — Vol. 153, №5. — P. 1011—1021.
22. **Ohoka N., Hattori T., Kitagawa M., Onozaki K., Hayashi H.** Critical and Functional Regulation of CHOP (C/EBP Homologous Protein) through the N-terminal Portion // *The Journal of Biological Chemistry*. — 2007. — Vol. 282, №49. — P. 35687—35694.
23. **Ohoka N., Yoshii S., Hattori T., Onozaki K., Hayashi H.** TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death // *The EMBO Journal*. — 2005. — Vol. 24. — P. 1243—1255.

24. **Oikawa D., Kimata Y., Kohno K., Iwawaki T.** Activation of mammalian IRE1 α upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins // *Exp. Cell Res.* — 2009. — Vol. 315, №15. — P. 2496–2504.
25. **Reimold A.M., Iwakoshi N.N., Manis J., Vallabhajosyula P., Szomolanyi-Tsuda E., Gravalles E.M., Friend D., Grusby M.J., Alt F., Glimcher L.H.** Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1 // *Nature.* — 2001. — Vol. 412(6844). — P. 300–307.
26. **Ron D., Walter P.** Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response // *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* — 2007. — Vol. 5. — P. 1–11.
27. **Shaffer A.L., Shapiro-Shelef M., Iwakoshi N.N., Lee A.H., Qian S.B., Zhao H., Yu X., Yang L., Tan B.K., Rosenwald A., Hurt E.M., Petroulakis E., Sonenberg N., Yewdell J.W., Calame K., Glimcher L.H., Staudt L.M.** XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation // *Immunity.* — 2004. — Vol. 21(1). — P. 81–93.
28. **Shen J., Chen X., Hendershot L., Prywes R.** ER Stress Regulation of ATF6 Localization by Dissociation of BiP/GRP78 Binding and Unmasking of Golgi Localization Signals // *Developmental Cell.* — 2002. — Vol. 3, №1. — P. 99–111.
29. **Shen J., Snapp E.L., Lippincott-Schwartz J., Prywes R.** Stable Binding of ATF6 to BiP in the Endoplasmic Reticulum Stress Response // *Molecular and Cellular Biology.* — 2005. — Vol. 25, №3. — P. 921–932.
30. **Shi Y., Vattem K.M., Sood R., An J., Liang J., Stramm L., Wek R.C.** Identification and Characterization of Pancreatic Eukaryotic Initiation Factor 2 α -Subunit Kinase, PEK, Involved in Translational Control // *Molecular and Cellular Biology.* — 1998. — Vol. 18, №12. — P. 7499–7509.
31. **Sidrauski C., Walter P.** The Transmembrane Kinase Ire1p Is a Site-Specific Endonuclease That Initiates mRNA Splicing in the Unfolded Protein Response // *Cell.* — 1997. — Vol. 90. — P. 1031–1039.
32. **Schindler A.J., Schekman R.** In vitro reconstitution of ER-stress induced ATF6 transport in COPII vesicles // *Proc. of the Nat. Acad. of Sci. of the USA.* — 2009. — Vol. 106, №42. — P. 17775–17780.
33. **Schroder M., Kaufman R.J.** ER stress and the unfolded protein response // *Mutation Research.* — 2005. — Vol. 569. — P. 29–63.
34. **Schroder M., Kaufman R.J.** The mammalian unfolded protein response // *Annu. Rev. Biochem.* — 2005. — Vol. 74. — P. 739–789.
35. **Sood R., Porter A.C., Ma K., Quilliam L.A., Wek R.C.** Pancreatic eukaryotic initiation factor-2 α kinase (PEK) homologues in humans, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* that mediate translational control in response to endoplasmic reticulum stress // *Biochem. J.* — 2000. — Vol. 346. — P. 281–293.
36. **Tate G., Kishimoto K., Hirayama Y., Suzuki T., Mitsuya T.** A novel missense mutation of the XBP1 gene in diffuse large B-cell lymphoma // *Cancer Genet. Cytogenet.* — 2009. — Vol. 190, №2. — P. 131–133.
37. **Tirasophon W., Welihinda A.A., Kaufman R.J.** A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endonuclease (Ire1p) in mammalian cells // *Genes and Development.* — 1998. — Vol. 12. — P. 1812–1824.
38. **Vattem K.M., Wek R.C.** Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells // *PNAS.* — 2004. — Vol. 101, №31. — P. 11269–11274.
39. **Wek R.C., Jiang H.-Y., Anthony T.G.** Coping with stress: eIF2 kinases and translational control // *Biochem. Soc. Trans.* — 2006. — Vol. 34. — P. 7–11.
40. **Ye J., Rawson R.B., Komuro R., Chen X., Dave U.P., Prywes R., Brown M.S., Goldstein J.L.** ER stress induces cleavage of Membrane-Bound ATF6 by the Same Proteases that Process SREBPs // *Molecular Cell.* — 2000. — Vol. 6. — P. 1355–1364.
41. **Yoshida H., Haze K., Yanagi H., Yura T., Mori K.** Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors // *J. Biol. Chem.* — 1998. — Vol. 273, №50. — P. 33741–33749.
42. **Yoshida H., Matsui T., Yamamoto A., Okada T., Mori K.** XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor // *Cell.* — 2001. — Vol. 107. — P. 881–891.
43. **Yoshida H., Oku M., Suzuki M., Mori K.** pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response // *The Journal of Cell Biology.* — 2006. — Vol. 172, №4. — P. 565–575.
44. **Zhang K., Wong H.N., Song B., Miller C.N., Scheuener D., Kaufman R.J.** The unfolded protein response sensor IRE1 α is required at 2 distinct steps in B cell lymphopoiesis // *J. Clin. Invest.* — 2005. — Vol. 115. — P. 268–281.

Поступила 05.11.13

Сведения об авторах:

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

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

Б.Б. Шойбонов^{1,2,3}, В.Ю. Баронец^{2,3}, Л.Ф.Панченко^{1,2}, А.А. Кубатиев¹

Экспресс-способ определения холестерина в иммунных комплексах

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

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный научный центр наркологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119002, Москва, М. Могильцевский пер., 3

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Разработан способ экспресс-определения холестерина в иммунных комплексах (ХИК). В предлагаемом способе преципитат иммунных комплексов, содержащих множественно модифицированные липопротеины низкой плотности, готовят из сыворотки крови человека путем обработки буфером, содержащим 8,3%-ный ПЭГ 3350 и 3,3%-ный ПВП 12600, в соотношении 1:1,2, инкубируют в течение 10 мин при комнатной температуре. Преципитат, содержащий ХИК, отделяют центрифугированием при 3100 г в течение 5 мин при 23°C, растворяют в буфере без ПЭГ и ПВП, определяют содержание холестерина с использованием ферментативного набора и при уровне содержания ХИК свыше 8,3 мг/дл констатируют повышенный уровень. Способ позволяет повысить точность количественного определения ХИК, проводить широкие скрининговые исследования для диагностики атеросклероза на доклинической стадии и контролировать эффективность проводимой терапии.

Ключевые слова: холестерин иммунных комплексов, атеросклероз, система комплемента

B.B. Shoibonov^{1,3}, V.Yu. Baronets^{1,3}, L.F. Panchenko^{1,2}, A.A. Kubatiev¹

A method of rapid determination of cholesterol in immune complexes

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

² National Research Center for Addictions Russian Ministry of Public Health and Social Development, , M. Mogiltzevsky, Moscow, 119002, Russia

³ Anokhin Institute of Normal Physiology, RAMS, Moscow, Russia, 125315, Moscow, Baltiiskaya str., 8

A method of rapid determination of cholesterol in immune complexes (CIC). In the proposed method precipitate immune complexes containing multiple modified low density lipoproteins from human serum are prepared by treatment with a buffer containing 8.3 PEG 3350, and 3.3% PVP 12600, in a ratio of 1:1.2, incubated for 10 min at room temperature. The precipitate containing the CIC is separated by centrifugation at 3100 g for 5 min at 23°C, dissolved in a buffer without PEG and PVP, the cholesterol is determined using an enzymatic kit and at a level of CIC more than 8.3 mg/dl ascertain higher level. The method improves the accuracy of the quantitative determination of CIC, conduct extensive screening tests to detect atherosclerosis as the pre-clinical stage and monitor the effectiveness of the therapy.

Key words: cholesterol immune complexes, atherosclerosis, complement system

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются ведущей причиной инвалидизации и смертности во всех развитых странах [7]. Предполагается, что к 2020 г. около 40% из всех смертей в мире будет обусловлено ССЗ [16]. Заболевание инициируется накоплением липопротеинов, в первую очередь липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), во внеклеточном матриксе сосудов. Частицы ЛПНП агрегируют и подвергаются окислительной или ферментативной

модификации. Модификация ЛПНП, вызванная частично конечными продуктами липидной перекисидации, потенцирует их атерогенную природу [14]. Аутоантитела оЛПНП выявляются в сыворотке крови больных ССЗ и здоровых людей [6, 11, 13], но их роль (антиатерогенная или проатерогенная) окончательно не определена.

В настоящее время в клинической лабораторной практике отсутствуют доступные для рутинных исследований методы определения иммунных комплексов, содержащих оЛПНП (ХИК). Известные способы определения ХИК в сыворотке крови проводят преципитацию циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) при разных концентрациях ПЭГ-6000

Для корреспонденции: Шойбонов Батожаб Батожагаралович, канд. хим. наук, вед. науч. сотр. лаб. биохимии ФГБУ НИИОПП РАМН, вед. науч. сотр. лаб. физиологии мотиваций ФГБУ НИИИФ РАМН. E-mail: shoibonov@mail.ru

(2,5%, 3,5% или 4%) в течение 18—24 ч при 23°C. Агрегированные иммунные комплексы, содержащие оЛПНП, осаждают центрифугированием, промывают буфером и определяют в преципитате холестерин после экстракции [2, 10, 12, 15]. Недостатком известных способов является отсутствие единых референтных величин по холестерину иммунных комплексов, длительность процедуры, неполная преципитация иммунных комплексов, содержащих множественно модифицированные липопротеины низкой плотности, и как следствие — отсутствие единых стандартных наборов для определения холестерина иммунных комплексов в условиях клинико-диагностических лабораторий.

Ранее нами был разработан способ определения уровня циркулирующих иммунных комплексов с использованием полиэтиленгликоля с молекулярной массой 3350 (ПЭГ-3350) [4]. Использование 5% ПЭГ-3350 и 50% сыворотки крови в преципитационной пробе позволило преципитировать из сыворотки преимущественно циркулирующие иммунные комплексы. Показано, что в данных условиях (10 мин при 23°C) агрегация иммунных комплексов, содержащих оЛПНП и обладающих высокой комплемент связывающей активностью, наблюдается в сыворотке крови только больных ИБС. Учитывая важную патогенетическую роль иммунных комплексов, содержащих множественно модифицированные липопротеины низкой плотности (ммЛПНП) при атеросклерозе, остается актуальной разработка простых, доступных для лабораторных исследований способов определения холестерина в иммунных комплексах (ХИК) [8, 10].

Цель работы — разработка экспресс-способа определения уровня холестерина в иммунных комплексах для рутинных исследований [5].

Методика

В работе исследовали сыворотку крови 15 доноров и 15 больных ИБС. Забор крови осуществляли из локтевой вены после 14-часового голодания. Содержание холестерина (ХС), триацилглицеридов (ТАГ) и общего белка в сыворотке крови определяли с помощью реактивов ЗАО «ЭКОлаб» (г.Электроргорск, Россия).

В работе использовали веронал, мединал, — фирмы «Seriva» (ФРГ), трис — «Merck» (ФРГ), полиэтиленгликоль 3350 «Sigma» (США), поливинилпирролидон 12600 ± 2700 «Синтвита» (Россия), препарат комплемента морской свинки, консервированные эритроциты барана — ЗАО «ЭКОлаб» (г.Электроргорск, Россия), остальные реактивы отечественного производства квалификации не ниже ч.д.а.

Приготовление эритроцитов барана, эритроцитов барана, сенсibilизированных антителами кролика (ЕА), изотонического вероналового буфера, рН 7,4 (VBS), буфера, содержащего ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} (VBS^{2+}) общепринятыми методами [1]. Буфер для агрегации ЦИК (Буфер-1): 8,3% ПЭГ-3350 и 3,3% ПВП 12600 в 0,01 М Трис-НСl-буфере, содержащем 0,15 М NaCl, 0,02% NaN_3 , рН 7,4. Буфер для растворения ЦИК (Буфер-2): 0,01 М трис-НСl-буфер, содержащий 0,15 М NaCl, 0,02% NaN_3 , рН 7,4.

Результаты и обсуждение

Подбор оптимальной концентрации ПВП-12600 (при постоянной концентрации 4,5% ПЭГ-3350) для осаждения иммунных комплексов, содержащих множественно модифицированные ЛПНП (ммЛПНП) из пулированной сыворотки крови здоровых доноров. К 50 мкл пулированной сыворотки крови здоровых доноров добавляли по 50 мкл 10% ПЭГ-3350 и от 10 до 40 мкл раствора 20% ПВП (молекулярная масса 12600±2700), тщательно перемешивали и инкубировали 10 мин при 23°C. Контрольная проба содержала только 5% ПЭГ-3350 и 50% пулированную сыворотку крови человека. Образовавшиеся агрегаты иммунных комплексов осаждали центрифугированием при 3100g в течение 5 мин при 23°C. Супернатант тщательно декантировали, и преципитат растворяли в 50 мкл буфера-2.

Определение холестерина и белков в ПЭГ/ПВП-преципитатах, приготовленных при разных концентрациях ПВП-12600 и постоянной концентрации 4,5% ПЭГ-3350. В преципитатах после растворения в 50 мкл буфера-2 определяли содержание холестерина и общего белка с использованием наборов реагентов фирмы «ЗАО ЭКОлаб» (Россия). Белок в преципитате представлял собой циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) содержащими наряду с другими антигенами, антиген ммЛПНП. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Определение степени связывания комплемент морской свинки циркулирующими иммунными комплексами в преципитатах, приготовленных при возрастающих концентрациях ПВП и постоянной концентрации 4,5% ПЭГ-3350. К 10 мкл растворов ПЭГ/ПВП-преципитатов, разбавленных в соотношении 1:99 буфером VBS^{2+} , добавляли 20 мкл раствора, разбавленного 1:19, комплемента морской

свинки. Общий объем доводили до 0,3 мл буфером VBS²⁺ и инкубировали 20 мин при 37°C. После предварительной инкубации добавляли 200 мкл ЕА и повторно инкубировали 30 мин при 37°C. После 30-минутной инкубации реакцию останавливали добавлением 2,5 мл холодного раствора 0,15 М NaCl, центрифугировали и определяли величину лизиса эритроцитов по выходу гемоглобина в супернатант. Контрольная проба не содержала преципитата иммунных комплексов. Пониженный гемолиз в опытных пробах по сравнению с контролем свидетельствовал о связывании комплемента. Степень лизиса эритроцитов (У) определяли по формуле:

$$У (\%) = [(X-R)/(H-R) \times 100],$$

где H, R и X — величины оптической плотности A₄₁₂ в гемолитических системах контрольной пробы, в контроле спонтанного лизиса ЕА и в опытной пробе соответственно.

Степень связывания комплемента (ССК) определяли по формуле:

$$ССК (\%) = 100 - У.$$

Полученные результаты представлены в табл. 1.

Определение содержания IgG в преципитате. Приготовление эритроцитов барана, сенсибилизированных гетерофильными антителами человека. Предварительно определяли титр гетерофильных антител в сыворотке крови человека. Использовали инактивированную прогреванием при 56°C в течение 20 мин сыворотку крови человека с титром гетерофильных антител 1:512 для получения иммунного комплекса (эритроциты барана-антитела человека (ЕА_ч) в субагглютинирующей дозе). После 30 мин инкубации сформированный комплекс ЕА_ч отделяли центрифугированием, осадок 3 раза промывали 0,15 М раствором NaCl при центрифугировании и готовили 1% взвесь ЕА_ч.

Определение титра антител барана к IgG человека с использованием, приготовленного иммунного комплекса (ЕА_ч). Предварительно титровали препарат антител барана в 96-луночных круглодон-

ных иммунологических плашках, добавляли равный объем 1% суспензии ЕА_ч, тщательно перемешивали и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре.

После инкубации определяли конечное разведение антител барана, при котором наблюдается полная гемагглютинация. Данное разведение считается 1 гемагглютинирующей единицей (ГАЕ). В нашем случае 1 ГАЕ был титр равный 1:32400. Для реакции торможения гемагглютинации (РТГА) использовали разведение 1:8100 (4 ГАЕ) препарата антител против IgG человека.

Проведение РТГА. Предварительно титровали преципитаты иммунных комплексов, разведенных 1:99, на 12 лунок в 96-луночных круглодонных иммунологических плашках. В качестве стандарта титровали препарат IgG с исходной концентрацией 1 мг/мл. После титрования преципитатов и стандартного препарата IgG добавляли равный объем разбавленного раствора антител против IgG человека, содержащего 4 ГАЕ, т.е. препарат антител был разбавлен 1:8100. Тщательно перемешивали и добавляли равный объем 1% суспензии иммунных комплексов (ЕА_ч), повторно перемешивали и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре.

После инкубации определяли для каждой пробы лунку, где наблюдалось торможение гемагглютинации. Расчеты проводили с использованием данных по торможению гемагглютинации стандартного раствора IgG человека. Полученные данные представлены в табл. 1.

Из данных, представленных в табл. 1, следует, что при концентрации 4,5% ПЭГ-3350 в сыворотке не наблюдается агрегации ни иммунных комплексов, содержащих множественно модифицированные липопротеины (ммЛПНП), ни нативных липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). Показателем агрегации и преципитации, как иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП, так и нативных ЛПНП, является содержание холестерина в преципитатах. Добавление ПВП-12600 в раствор сыворотки, содержащей 4,5% ПЭГ-3350, вызывает агрегацию иммунных

Таблица 1

Содержание холестерина, общего белка, IgG в преципитатах и степень связывания комплемента (ССК) иммунными комплексами, приготовленными из пулированной сыворотки крови доноров, в зависимости от концентрации ПВП-12600 при постоянной концентрации 4,5% ПЭГ-3350

Концентрация ПВП-12600, %	0,3	0,7	1,0	1,3	1,8	2,0	2,3	2,7	3,0	3,3	0
Холестерин, мг/дл	1,1	1,3	2,0	5,3	7,1	8,5	10,2	15,7	20,4	24,2	0
IgG мг/мл	0,06	0,06	0,12	0,120	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0
Общий белок, мг/мл	0,5	0,62	0,74	0,82	0,97	1,2	1,4	1,62	1,88	2,1	0,3
ССК, %	7	14	26	50	65	64	66	63	68	67	0

комплексов, содержащих ммЛПНП от 0,3% до 1,8%. Дальнейшее увеличение концентрации ПВП-12600 выше 1,8% в системе приводит к агрегации и преципитации нативных ЛПНП и ЛПОНП. Об этом свидетельствует отсутствие возрастания степени связывания комплемента преципитатами, полученными при концентрации ПВП-12600 свыше 1,8%. Сохранение степени связывания комплемента на уровне 65—68% и возрастание концентрации холестерина и общего белка в преципитатах при увеличении концентрации ПВП-12600 (более 1,8%) свидетельствует, с одной стороны, о полной агрегации иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП, с другой стороны, об агрегации нативных ЛПНП и ЛПОНП, которые не обладают комплемент связывающей способностью.

Возрастание уровня общего белка также подтверждает агрегацию и преципитацию нативных ЛПНП и ЛПОНП. Наличие IgG в преципитатах, приготовленных в присутствии ПВП, свидетельствует об иммунных комплексах, содержащих ммЛПНП, так же как постоянный уровень IgG в преципитатах, полученных при концентрации ПВП 1,8% и выше, свидетельствует о специфической преципитации иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП.

Таким образом, при постоянной концентрации ПЭГ 3350 (4,5%) и концентрациях ПВП-12600 в диапазоне от 0,3% до 1,8% наблюдается избирательная агрегация и преципитация иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП, и не наблюдается агрегация и преципитация как нативных ЛПНП и ЛПОНП, так и свободных IgG.

Определение содержания холестерина в иммунных комплексах в сыворотке крови доноров и больных ишемической болезнью сердца

Приготовление преципитата сыворотки крови при условиях 1,8% ПВП-12600 и 4,5% ПЭГ-3350. К 50 мкл сыворотки крови больных ишемической болезнью сердца (ИБС) и относительно здоровых доноров добавляли 60 мкл буфера-1 и инкубировали 10 мин при 23°C. Образовавшиеся агрегаты иммунных комплексов осаждали центрифугированием при 23°C в течение 5 мин при 3100g. Супернатант декантировали и осадок растворяли в 50 мкл буфера-2. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Как видно из данных, представленных в табл. 2, в группе относительно здоровых доноров в трех пробах содержание ХИК было заметно выше, чем в остальных пробах этой контрольной группы. Полученные данные о повышенном уровне ХИК у трех доноров, возможно, свидетельствуют о субклинической стадии атеросклероза. При исключении данных доноров из группы контроля по ХИК, средний уровень ХИК составляет $7,07 \pm 1,15$, при колебании от 5,9 до 8,3 мг/дл. Следовательно, уровень ХИК до 8,3 мг/дл можно предварительно считать нормальным уровнем у здоровых людей. В группе больных ИБС в 100% случаев определяется повышенный уровень ХИК, и колебания составили от 11,7 до 40,3 мг/дл.

Ранее нами был разработан способ определения множественно модифицированных липопротеинов (ммЛПНП) и проведено исследование 750 относи-

Таблица 2

Содержание холестерина в иммунных комплексах (ХИК) в сыворотке крови доноров и больных ИБС

Доноры	ХИК, мг/дл	Больные ИБС	ХИК, мг/дл
1	5,2	1	12,6
2	7,4	2	14,2
3	6,8	3	11,7
4	6,5	4	17,4
5	7,8	5	22,3
6	8,2	6	14,8
7	6,8	7	16,3
8	17,8	8	13,7
9	9,2	9	13,4
10	6,7	10	12,2
11	15,3	11	24,8
12	8,3	12	40,3
13	17,5	13	16,5
14	5,9	14	22,4
15	6	15	18,2
M ± m	9,03 ± 4,21	M ± m	18,05 ± 7,34

тельно здоровых людей [3]. У 38% обследованных был выявлен повышенный уровень ммЛПНП. Учитывая то, что у 50% людей атеросклероз развивается при нормальных показателях липидов (общий холестерин, холестерин ЛПНП и триглицериды) [9], нами были отобраны лица молодого возраста (до 40 лет) с нормальным уровнем холестерина и триглицеридов для инструментального подтверждения атеросклероза методом ультразвукографии в В-режиме толщины интимо-медиаляного слоя сонных артерий. Полученные результаты свидетельствовали о том, что только у 60% лиц с повышенным уровнем ммЛПНП наблюдалось утолщение интимо-медиаляного слоя сонных артерий, в то время как у 40% отсутствовали такие изменения. Отсутствие изменений со стороны сонных артерий при повышенном уровне ммЛПНП, возможно, было обусловлено антиатерогенным эффектом аутоиммунной реакции организма данных пациентов.

Для оценки аутоиммунной реакции организма человека на ммЛПНП нами был модифицирован способ определения циркулирующих иммунных комплексов, разработанный ранее [4]. Суть модификации заключается в комбинированном использовании ПЭГ-3350 и ПВП-12600. При увеличении концентрации ПВП-12600 до 1,8% в присутствии 4,5% ПЭГ-3350 в пулированной сыворотке крови здоровых доноров наблюдается агрегация ЦИК, содержащих оЛПНП. При концентрации ПВП-12600 выше 1,8% начинается агрегация нативных ЛПНП, о чем свидетельствовали увеличение содержания холестерина в ПЭГ/ПВП-преципитате при постоянной комплемент связывающей активности его. Таким образом, использование 1,8% ПВП, с одной стороны, позволило снизить концентрацию ПЭГ-3350 с 5% до 4,5% в преципитационной пробе. С другой стороны, при данных условиях наблюдается агрегация ЦИК, содержащих оЛПНП, в сыворотке здоровых доноров. Учитывая наличие сквенджер-рецепторов и аутоантител к оЛПНП у здоровых людей, можно считать, что выявление ЦИК, содержащих оЛПНП, является вполне логичным и свидетельствует о высокой чувствительности метода.

В известных методах преципитации ЦИК, содержащих оЛПНП, используют разные концентрации или ПЭГ-6000 (от 2,5% до 4%), или ПЭГ-8000 (3,5%), что свидетельствует о проблеме полноты осаждения циркулирующих иммунных комплексов. Контроль полноты осаждения данных комплексов с одновременным использованием теста потребления комплемента и уровня холестерина в ПЭГ/ПВП-преципитатах позволил нам подобрать оптимальные концентрации реагентов в преципитационной пробе. При этом для определения холестерина в преципитате был

использован стандартный ферментный набор, используемый в лабораторной диагностике.

Использование смеси ПЭГ-3350 и ПВП-12600 позволило также сократить до 10 мин инкубацию (23°C) преципитационной пробы, что существенно сократило время всей процедуры анализа. Агрегация ЦИК, содержащих оЛПНП, в течение 10 мин при 23°C свидетельствует о достаточно специфической агрегации ЦИК. Так, при увеличении времени инкубации до 24 ч нами не было отмечено дополнительной преципитации как белков сыворотки, так и нативных липопротеинов низкой плотности в ПЭГ/ПВП-преципитате. Кроме того, инкубация опытной преципитационной пробы при 23°C полностью исключает преципитацию криоглобулинов, которая наблюдается при 4°C, и исключает необходимость дополнительной стадии аффинной хроматографии или гель-фильтрации. Комплемент-связывающая активность и присутствие IgG в ПЭГ/ПВП-преципитате подтверждает осаждение циркулирующих иммунных комплексов, содержащих оЛПНП.

Таким образом, способ позволяет повысить точность количественного определения холестерина в циркулирующих иммунных комплексах сыворотки крови человека. Выявление повышенного уровня ХИК при широких скрининговых обследованиях может быть предиктором атеросклероза на доклинической стадии. Доступность реагентов и простота способа определения ХИК в лабораторной практике позволит изучать патогенез атеросклероза и контролировать эффективность проводимой терапии. Дальнейшие исследования циркулирующих иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП, позволят прогнозировать индивидуальное течение атеросклеротического процесса у пациента в зависимости от степени активации системы комплемента этими комплексами на доклинической стадии заболевания.

Список литературы

1. *Меньшиков В.В., Делеторская Л.Н., Золотницкая Р.П.* и др. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. — М.: Медицина, 1987. — 368 с.
2. *Тертов В.В., Качарава А.Г., Саядян Х.С.* и др. Холестерин содержащие циркулирующие иммунные комплексы — компонент сыворотки крови больных с ишемической болезнью сердца, обуславливающий её атерогенность // Кардиология. — 1989. — Т. 29, №8. — С. 35—38.
3. *Шойбонов Б.Б.* Экспресс-определение модифицированных липопротеинов // Кардиология Беларуси. — 2011. — Т. 5, №18. — С. 49—50.
4. *Шойбонов Б.Б., Борголов В.М., Баронец В.Ю.* и др. Тест-система определения циркулирующих иммунных комплексов // Патент РФ №2452962 от 10.06.2012 г.
5. *Шойбонов Б.Б., Борголов В.М., Баронец В.Ю., Панченко Л.Ф., Кубатиев А.А.* Экспресс-способ опреде-

ления холестерина в иммунных комплексах // Заявка на изобретения №2012155495 от 20.12.2012 г.

6. **Ameli S., Hultgardh-Nilsson A., Regnstrom J., Calara F.** et al. Effect of immunization with homologous LDL and oxidized LDL on early atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 1996. — Vol. 16. — P. 1074–1079.

7. **Braunwald E.** Shattuck lecture — cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities // *N. Engl. J. Med.* — 1997. — Vol. 337. — P. 1360–1369.

8. **Burut D.F.P., Karim Y., Ferns G.A.A.** The Role of Immune Complexes in Atherosclerosis // *Angiology.* — 2010. — Vol. 61, №7. — P. 679–689.

9. **Crundy S.M.** Role of low-density lipoproteins in atherogenesis and development of coronary heart disease // *Clin. Chem.* — 1995. — Vol. 41. — P. 139–146.

10. **Lopes-Virella M.F., Brent McHenry M., Lipsitz S.** et al. Immune complexes containing modified lipoproteins are related to the progression of internal carotid intima-media thickness in patients with type 1 diabetes // *Atherosclerosis.* — 2007. — Vol. 190. — P. 359–369.

11. **Schumacher M., Eber B., Tatzber F.** et al. Transient reduction of autoantibodies against oxidized LDL in patients

with acute myocardial infarction // *Free Radic. Biol. Med.* — 1995. — Vol. 18. — P. 1087–1091.

12. **Szondy E., Mezey Z., Fust G.** et al. Serial measurement of circulating immune complexes in myocardial infarction // *Br. Heart J.* — 1981. — Vol. 46. — P. 93–98.

13. **Uusitupa M.I., Nishanen L., Luoma J.** et al. Autoantibodies against oxidized LDL do not predict atherosclerotic vascular disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 1996. — Vol. 16. — P. 1236–1242.

14. **Vaarala O.** Antibodies to oxidised LDL // *Lupus.* — 2000. — Vol. 9. — P. 202–205.

15. **Virella G., Carter R.E., Saad A.** et al. Distribution of IgM and IgG antibodies to oxidised LDL in immune complexes isolated from patients with type 1 diabetes and its relationship with nephropathy // *Clin. Immunol.* — 2008. — Vol. 127, №3. — P. 394–400.

16. **Willerson J.T., Ridker P.M.** Inflammation as a cardiovascular risk factor // *Circulation.* — 2004. — Vol. 109 (Suppl. 1). — P. II2–II10.

Поступила 20.03.13

Сведения об авторах:

Баронец Валерия Юрьевна, старш. науч. сотр. лаб. биохимии ФГБУ НИЦ наркологии Минздрава России, науч. сотр. лаб. физиологии мотиваций ФГБУ НИИИФ им. П.К. Анохина

Панченко Леонид Федорович, д.м.н., проф., акад. РАМН, зав. лаб. биохимии ФГБУ НИИОПП РАМН

Кубатиев Аслан Амирханович, д.м.н., проф., акад. РАМН, дир. ФГБУ НИИОПП РАМН

Б.Б. Шойбонов^{1,2,3}, В.Р. Хайбулин⁴, В.Ю. Баронец^{2,3}, Л.Ф. Панченко^{1,2}, А.А. Кубатиев¹

Экспресс-оценка реактивности системы комплемента

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8; e-mail: shoibonov@mail.ru

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный научный центр наркологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119002, Москва, М. Могильцевский пер., 3

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

⁴ Медицинский центр «Дали», Москва

Авторами разработан новый показатель состояния гуморального иммунитета, характеризующий реактивность системы комплемента (РСК). РСК исследовали в гемолитическом тесте с использованием эритроцитов барана, аутологичных гетерофильных антител и комплемента в условиях «нагрузки» в виде 0,29 М NaCl в системе. Проведено исследование сывороток крови 10 здоровых доноров и 20 пациентов клиничко-диагностического центра, проходящих обследование на наличие хронических инфекций. Ингибирование комплемента 0,29 М NaCl на уровне 30–70% у здоровых доноров принято за показатель, характеризующий нормальное состояние РСК сыворотки крови человека. При исследовании пациентов у 11 чел. (55%) из 20 обследованных выявлена высокая РСК (степень лизиса >70%), у 6 чел. (30%) — нормальную и у 3 чел. (15%) — пониженную (степень лизиса <30%) реактивность системы комплемента. Таким образом, исследование реактивности системы комплемента в условиях «нагрузки», т.е. в присутствии 0,29 М NaCl в опытной пробе, выявляет функциональные сдвиги в сторону усиления как, так и снижения активности комплемента.

Ключевые слова: система комплемента, гетерофильные антитела, реактивность системы комплемента

В.В. Shoibonov^{1,2,3}, V.R. Khajbulin⁴, V.Yu. Baronets^{1,2}, L.F. Panchenko^{1,2}, A.A. Kubatiev¹

Rapid assessment of the complement system reactivity

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

² National Research Center for Addictions Russian Ministry of Public Health, Moscow, Russia

³ Anokhin Institute of Normal Physiology, RAMS, Moscow, Russia

⁴ Medical center «Dali», Moscow

The authors developed a new indicator of humoral immunity, which characterizes the complement system reactivity (CSR). Complement system reactivity has been investigated in haemolytic assay using sheep red blood cells, autologous heterophile antibodies and complement in a «load» as 0.29 M NaCl in the system. There has been made a study of blood sera of 10 healthy donors and 20 patients who undergo screening for chronic infections in clinical-diagnostic centers. Inhibition of complement — 0.29 M NaCl at a level of 30–70% in healthy donors is taken as an indicator that characterizes normal complement system reactivity of a human serum. Investigations have revealed in 11 patients (55%) of the 20 examined people high complement system reactivity (lysis degree more than 70%), in 6 patients (30%) — normal complement system reactivity, and in 3 patients (15%) — low complement system reactivity (lysis degree less than 30%). Thus, the study of the complement system reactivity in a «load», in the presence of 0.29 M NaCl in the test sample, detects functional changes, both reinforcing and reducing complement activity.

Key words: complement system, heterophile antibodies, complement system reactivity

Система комплемента (СК) является частью иммунной системы, состоит более чем из 30 компонентов и играет ключевую роль как в солибилизации и элиминации иммунных комплексов, так и в иммунном ответе на инфекционные агенты, чужеродные антиге-

ны, опухолевые и вирус-инфицированные клетки [9, 10]. В настоящее время описаны три пути активации СК, по которым комплемент может запускаться: классический, лектиновый и альтернативный. Каждый из путей инициируется через разные механизмы, общим для всех путей являются серии реакций протеолитической активации и стадий амплификаций, которые служат для расщепления компонента C3 [6]. C3 является центральным компонентом системы комплемента и содержится в наибольшем количестве в сыво-

Для корреспонденции: Шойбонов Батожаб Батожагаралович, канд. хим. наук, вед. науч. сотр. лаб. биохимии ФГБУ НИИОПП РАМН, вед. науч. сотр. лаб. физиологии мотиваций ФГБУ НИИИФ РАМН. E-mail: shoibonov@mail.ru

ротке крови [7]. Физиологическая активация системы комплемента (СК) приводит к опсонизации и фагоцитозу патогенов, солюбилизации и элиминации иммунных комплексов, привлечению иммунокомпетентных клеток к очагу воспаления путем генерирования анафилоксинов C3a и C5a, а также к формированию мембрано-атакующего комплекса на поверхности патогенов и их лизису. От реактивности системы комплемента (РСК) зависит исход иммунного воспаления при атеросклерозе, тяжесть реперфузионного синдрома при остром инфаркте миокарда, инсульте, а также острое отторжение трансплантата [5].

Для исследования системы комплемента в лабораторной диагностике определяют его гемолитическую активность. Суть метода заключается в следующем:

1) разные разведения исследуемой сыворотки добавляют к эритроцитам барана (ЭБ), сенсибилизированным антителами кролика (ЭБ-А_{кр});

2) степень гемолиза оценивают фотометрически по выходу гемоглобина в раствор.

Активность комплемента выражают в гемолитических единицах. За одну гемолитическую единицу комплемента (СН₅₀) принимают количество последнего, вызывающее гемолиз 50% стандартной суспензии ЭА-А_{кр}. В 1 мл сыворотки крови здоровых доноров обычно содержится 20-40 СН₅₀ [1].

Ранее был разработан и обоснован новый показатель состояния гуморального иммунитета, характеризующий эффекторную, комплемент-активирующую, функцию гетерофильных антител (ГА) человека. Комплемент-активирующую функцию ГА сыворотки крови человека исследовали в гемолитическом тесте с использованием аутологичного комплемента и эритроцитов барана. Для определения комплемент-активирующей функции ГА проводили лизис ЭБ в 0,8% сыворотке крови человека, используя в качестве сенсибилизирующих антител аутологичные ГА. Определяли титр ГА в этой же сыворотке в тесте геагглютинации с ЭБ (проба Пауля-Буннеля). Рассчитывали коэффициент эффекторной (комплемент-активирующей) функции гетерофильных антител (К_{ЭФГА}) как отношение степени лизиса к обратному титру ГА. Было проведено исследование 20 сывороток крови относительно здоровых доноров и по величине К_{ЭФГА} предложены диагностические критерии (высокая, повышенная, нормальная, пониженная и низкая комплемент-активирующая функции ГА). К_{ЭФГА} был связан с относительным уровнем содержания циркулирующих иммунных комплексов и характеризовал длительность и степень функциональных нарушений гуморального иммунитета [3]. Несмотря на информативность данного метода, многостадийность определения К_{ЭФГА} не позволяет широко использовать его в рутинных исследованиях.

Цель исследования — разработка простого способа экспресс-анализа реактивности системы комплемента для рутинных исследований.

Методика

В работе использовали 5,5-диэтилбарбитуровую кислоту (веронал) и ее натриевую соль (мединал), азид натрия — фирмы «Serwa» (ФРГ), остальные реактивы, квалификация не ниже ч.д.а., отечественного производства. Комплемент морской свинки, эритроциты барана, консервированные для реакции связывания комплемента — ЗАО «ЭКОлаб», г.Электрогорск, МО, Россия.

Приготовление эритроцитов барана (ЭБ), эритроцитов барана, сенсибилизированных антителами кролика (ЭБ-А_{кр}), изотонического вероналового буфера, содержащего ионы Ca²⁺ и Mg²⁺ (VBS²⁺), описано ранее [1].

Определение гемолитической активности комплемента сыворотки крови человека

200 мкл ЭБ-А_{кр} (1,5×10⁸ кл/мл) инкубировали с 20 мкл сыворотки крови человека, разбавленной 1:9, в общем объеме 500 мкл, доведенном буфером VBS²⁺. Одновременно ставили контроль на спонтанный гемолиз ЭБ-А_{кр} (200 мкл ЭБ-А_{кр} + 300 мкл VBS²⁺) и контроль на полный лизис (200 мкл ЭБ-А_{кр} + 300 мкл H₂O). Пробирки встряхивали и инкубировали 30 мин при 37°C. После инкубации в каждую пробу добавляли по 2,5 мл холодного раствора 0,15 М NaCl, центрифугировали и определяли степень гемолиза по величине A₄₀₅ супернатанта. Для расчета степени лизиса (У, %) использовали формулу:

$$У, \% = [(X - P) / (H - P) \times 100],$$

где H, R и X — величины оптической плотности при A₄₁₂ гемолитической системы при полном лизисе, в контроле спонтанного лизиса ЭБ-А_{кр} и в опытной пробе соответственно.

Определение комплемент-активирующей функции гетерофильных антител

200 мкл ЭБ (1,5×10⁸ кл/мл) инкубировали с 40 мкл сыворотки крови человека, разбавленной 1:9, в общем объеме 500 мкл, доведенном буфером VBS²⁺. Одновременно ставили контроль на спонтанный гемолиз ЭБ (200 мкл ЭБ + 300 мкл VBS²⁺) и контроль на полный лизис (200 мкл ЭБ + 300 мкл H₂O). Пробирки встряхивали и инкубировали 30 мин при 37°C. После инкубации определяли степень лизиса, как описано выше.

Определение титра гетерофильных антител (ГА)

Для исключения иммунного гемолиза, в исследуемых сыворотках инактивировали комплемент прогреванием в течение 20 мин при 56°C. Реакцию гемагглютинации ставили в стандартных пластиковых 96-луночных микропланшетах с круглодонными лунками. Во все лунки вносили по 40 мкл 0,15 М раствора NaCl и готовили серии двукратных разведений сывороток. Затем вносили по 40 мкл стандартизированной суспензии ЭБ ($1,5 \times 10^8$ кл/мл) и перемешивали содержимое лунок путем осторожного встряхивания панели в горизонтальной плоскости. Панель, прикрытую сверху стеклянной пластинкой, выдерживают 60 мин при 37°C. Результаты реакции учитывали визуально, определяли последнее разведение сыворотки, в котором еще произошла гемагглютинация. Контроль эритроцитов не содержал инактивированной сыворотки.

Определение коэффициента эффекторной функции гетерофильных антител по системе комплемента (КЭФГА)

Рассчитывали КЭФГА по формуле:

$$K_{ЭФГА} = Y / T_{ГА}$$

где:

Y — степень лизиса, %;

T_{ГА} — обратный титр гетерофильных антител к эритроцитам барана [2].

Результаты и обсуждение

Определение оптимальной концентрации NaCl для 50% ингибирования активации системы комплемента

К 200 мкл суспензии ЭБ ($1,5 \times 10^8$ кл/мл) добавляли 100 мкл пулированной сыворотки крови человека от 10 здоровых доноров и 5—50 мкл 1,5 М раствора NaCl (интервал концентрации от 0,17 М до 0,32 М NaCl в системе) и в общем объеме 400 мкл, доведенном буфером VBS²⁺, инкубировали 10 мин при 37°C. Одновременно ставили контроль на спон-

танный (200 мкл ЭБ + 200 мкл VBS²⁺) и полный лизис ЭБ (200 мкл ЭБ + 200 мкл H₂O). После инкубации останавливали реакцию гемолиза добавлением 2,6 мл 0,75 М раствора NaCl, центрифугировали 10 мин при 1500 об./мин и определяли степень гемолиза по величине A₄₀₅ супернатанта. Степень лизиса эритроцитов (Y) определяли по формуле, приведенной в разделе «Методика».

Степень ингибирования (СИ) определяли как разность показателей лизиса в контрольной пробе и в опытных пробах, содержащих возрастающие концентрации NaCl, по формуле:

$$СИ(\%) = (100 - Y),$$

где:

100 — степень лизиса в контрольной пробе;

Y — степень лизиса в опытных пробах.

Полученные данные приведены в табл. 1.

Как видно из данных, представленных в табл. 1, лизис эритроцитов барана ингибируется при повышении ионной силы буфера, обусловленной возрастающей концентрацией NaCl в пробе. 50% ингибирования активности классического пути комплемента пулированной сыворотки крови наблюдается в присутствии 0,29 М NaCl.

Определение ингибирования лизиса эритроцитов барана сывороткой крови здоровых доноров в присутствии 0,29 М NaCl

Исследования проведены аналогично выше описанным условиям только при постоянной концентрации NaCl в гемолитической системе равной 0,29 М. Вместо пулированной сыворотки крови человека использовали индивидуальные сыворотки крови здоровых доноров. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Как видно из данных, представленных в табл. 2, степень ингибирования лизиса эритроцитов барана сывороткой крови доноров в присутствии 0,29 М NaCl в гемолитической системе наблюдалось на уровне 30—70%. Ингибирование комплемента 0,29 М NaCl на уровне 30—70% у здоровых доноров нами принято за показатель, который характери-

Таблица 1

Зависимость степени ингибирования (СИ) лизиса эритроцитов барана 25% пулированной сывороткой крови человека от концентрации NaCl

Концентрация NaCl, моль/л	0,150	0,248	0,260	0,274	0,29	0,293	0,310	0,320
СИ, %	0	0	8	17	50	56	90	100

Таблица 2

Показатели степени ингибирования (СИ) лизиса эритроцитов барана сывороткой крови доноров в присутствии 0,29 М NaCl

№ сыворотки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
СИ, %	42	51	70	46	58	44	62	30	66	54

МЕТОДИКА

зует нормальное состояние реактивности системы комплемента сыворотки крови человека.

Проведены сравнительные исследования реактивности системы комплемента (РСК) и комплемент-активирующей функции гетерофильных антител (КАФГА) в сыворотке крови 20 пациентов клинико-диагностического центра.

Для исследования функциональной активности комплемента использовали унифицированный метод определения гемолитической активности комплемента по 50% гемолизу [1] с незначительной модификацией. Эритроциты барана, сенсibilизированные антителами кролика лизировали 0,4% сывороткой крови человека. Одновременно ставили контроль на спонтанный гемолиз ЭБ и контроль на полный лизис. Степень лизиса эритроцитов определяли по величине A_{405} супернатанта, как описано в разделе «Методика». Данные определения активности комплемента приведены в табл. 3.

Средняя величина степени лизиса эритроцитов в присутствии 0,4% сыворотки крови составила $63,65 \pm 7,06\%$ при колебании от 52% до 79%.

Таким образом, тест на комплемент-опосредованный гемолиз ЭБ- $A_{кр}$ в присутствии 0,4% сыворотки крови человека выявил незначительные сдвиги в сторону усиления активности системы комплемента только у четырёх (20%) из 20 обследованных пациентов.

Следующий этап исследований включал определение титра гетерофильных антител к эритроцитам барана. Для исключения иммунного гемолиза исследуемые сыворотки были предварительно инактивированы прогреванием при 56°C в течение 20 мин. Реакцию гемагглютинации ставили в стандартных пластиковых 96-луночных микроплашетах с круглодонными лунками. Проведенная проба Пауля—Буннеля также не выявила каких-либо сдвигов в содержании гетерофильных антител во всех исследованных сыворотках. Результаты пробы Пауля—Буннеля представлены в табл. 3.

Как видно из данных, представленных в табл. 3, гетерофильные антитела были выявлены во всех исследованных сыворотках крови пациентов, и средний титр ГА к эритроцитам барана составил $1:(10,4 \pm 8,4)$ при колебаниях от 1:4 до 1:32.

Для определения эффекторной, комплемент активирующей, функции гетерофильных антител была выбрана концентрация сыворотки равная 0,8%, достаточная для полного лизиса ЭБ при концентрации $0,75 \times 10^8$ кл/мл. При данной концентрации сыворотки лизис ЭБ был лимитирован только содержанием гетерофильных антител, т.е. степень лизиса ЭБ зависела только от эффекторной, комплемент активирующей функции ГА.

Исследования проводили следующим образом. 200 мкл эритроцитов барана ($1,5 \times 10^8$ кл/мл) инкубиро-

Таблица 3

Показатели Активности системы комплемента (АСК), Комплемент активирующей функции гетерофильных антител (КЭФГА), Титра ГА, $K_{ЭФГА}$ и Реактивности системы комплемента (РСК) в сыворотках крови пациентов

№ сыворотки	Активность СК, %	КАФГА, % лизиса	Титр ГА (1 : ...)	КЭФГА, ЕД	РСК, %
1	65	66	16	4,1	65
2	58	81	8	10,1	96
3	62	72	4	18,0	71
4	67	93	8	11,6	100
5	63	88	8	11,0	100
6	56	51	8	6,4	63
7	70	38	4	9,5	17
8	66	48	8	6,0	63
9	58	76	32	2,4	93
10	79	90	8	11,3	100
11	58	31	16	1,9	13
12	54	31	8	3,9	13
13	74	72	4	18,0	91
14	52	56	4	14,0	37
15	64	62	4	15,5	51
16	72	89	16	5,6	95
17	58	69	4	17,3	30
18	62	76	8	9,5	100
19	71	87	32	2,7	100
20	64	79	8	9,9	83
M ± m	$63,65 \pm 7,06$	$67,75 \pm 19,56$	$10,4 \pm 8,4$	$9,4 \pm 5,3$	$69,05 \pm 31,96$

вали с разбавленной сывороткой крови человека в общем объеме 0,5 мл, доведенном буфером VBS²⁺ (концентрация сыворотки 0,8%). Одновременно ставили контроль на спонтанный гемолиз эритроцитов и контроль на полный лизис. Пробирки встряхивали, инкубировали и определяли степень лизиса, как описано в экспериментальной части. Данные гемолиза ЭБ с участием в качестве сенсibiliзирующих антител исследуемой сыворотки крови и аутологичного комплемента приведены в табл. 3.

Из данных, представленных в табл. 3, видно, что использование гетерофильных антител к эритроцитам барана в гемолитическом тесте, когда формируется иммунный комплекс (ЭБ-ГА) и активируется аутологичная система комплемента по классическому пути, позволяет сформировать модельную систему (иммунный комплекс) приближенно к условиям *in vivo*. При сравнении результатов гемолиза ЭБ-А_{кр} 0,4% сывороткой и гемолиза ЭБ, не сенсibiliзированных антителами кролика 0,8% сывороткой (табл. 3) видно, что концентрация сыворотки 0,8% является оптимальной для анализа комплемент-активирующей функции ГА (уровень лизиса колеблется в пределах от 31% до 93%).

Для анализа степени лизиса ЭБ и содержания ГА необходимо было привести их к единой системе. Для этого авторами был предложен новый показатель — коэффициент эффекторной, комплемент-активирующей, функции гетерофильных антител (КЭФГА). Для расчета КЭФГА была использована формула:

$$K_{ЭФГА} (ЕД) = Y / T_{ГА},$$

где:

Y — степень лизиса, %;

T_{ГА} — обратный титр гетерофильных антител к ЭБ.

Данные по КЭФГА обследованных пациентов приведены в табл. 3.

Как видно из данных, представленных в табл. 3, только в трех пробах сывороток крови КЭФГА был в пределах нормальных значений, т.е. КЭФГА=6,0±0,4 ЕД. В 5 сыворотках (25%) КЭФГА был пониженным и в среднем составил 3,0±1,0 ЕД при колебаниях от 1,9 ЕД до 4,1 ЕД. В остальных 12 сыворотках КЭФГА был повышенным и в среднем составил 13,0±3,4 ЕД (колебания от 9,5 ЕД до 18,0 ЕД).

Таким образом, расчет коэффициента эффекторной функции гетерофильных антител у обследованных пациентов позволяет выявлять функциональные сдвиги в комплемент-активирующей функции аутологичных ГА. Повышенный коэффициент определяется при наличии воспалительного процесса в организме и учитывая то, что данный контингент пациентов проходил обследование в клинко-диагностическом центре на наличие хронических инфекций, полученные результаты не вызывают сомнения в достоверности. Ранее нами было показано, что определение уровня иммуноглобулинов класса G, A или

M не показало каких-либо сдвигов, т.е. содержание их было в пределах референтных величин [4]. Выявление в 25% случаев сниженной эффекторной, комплемент-активирующей функции гетерофильных антител свидетельствует о функциональном сдвиге гуморального звена иммунитета в сторону подавления реактивности. В конечном счете, сниженная комплемент-активирующая функция антител может привести к нарушению солубилизации и элиминации циркулирующих иммунных комплексов и как следствие, к болезням иммунных комплексов.

Определение реактивности системы комплемента

К 200 мкл суспензии ЭБ (1,5×10⁸ кл/мл) добавляли 100 мкл индивидуальной сыворотки крови обследуемого, 38 мкл 1,5 М раствора NaCl и 62 мкл буфера VBS²⁺. Затем инкубировали 10 мин при 37°C. Параллельно ставили контроли: контроль сыворотки (200 мкл ЭБ + 100 сыворотки + 100 мкл VBS²⁺; контроль на спонтанный (200 мкл ЭБ + 200 мкл VBS²⁺) и полный лизис эритроцитов барана (200 мкл ЭБ + 200 мкл H₂O). После инкубации останавливали реакцию гемолиза добавлением 2,6 мл 0,75 М раствора NaCl, центрифугировали 10 мин при 1500 об./мин и определяли степень гемолиза по величине A₄₀₅ супернатанта. Степень лизиса эритроцитов (Y) определяли по формуле, как описано выше. Полученные результаты приведены в табл. 3.

Как видно из данных, представленных в табл. 3, реактивность системы комплемента сыворотки крови у 11 обследованных пациентов (55%) была высокой (степень лизиса >70%), у 6 чел. (30%) — в пределах нормальных величин (степень лизиса от 30% до 70%) и у 3 чел. (15%) — пониженной (степень лизиса <30%). Таким образом, исследование реактивности системы комплемента в условиях «нагрузки», т.е. в присутствии 0,29 М NaCl в опытной пробе, выявляет функциональные сдвиги в сторону как усиления, так и снижения литической активности комплемента. Причем результаты по РСК полностью совпадают с данными, полученными при исследовании комплемент-активирующей функции гетерофильных антител (КАФГА) в этих же сыворотках. В тесте определения КАФГА лимитирующим компонентом является, с одной стороны, титр ГА, с другой стороны, комплемент-связывающая и активирующая функция ГА. Включение титра ГА в расчет КЭФГА вносит определенные различия в данные по эффекторным функциям ГА и реактивности системы комплемента. Следует отметить, что использование «нагрузки» в виде 0,29 М NaCl в гемолитической системе основано на данных, полученных S. Maeda и S. Nagasawa [8]. Авторами было показано, что повышение ионной силы буфера за счет NaCl в инкубационной системе вызывает дозозависимое ингибирование формирования С3-конвертазы классического пути за счет ингибирования гидролиза компонента С2 ферментом С1s [8].

Предварительные наши исследования по влиянию возрастающих концентраций NaCl на гемолитическую активность комплемента пулированной сыворотки крови здоровых доноров полностью совпадали с данными других исследователей [8]. Использование 0,29 М NaCl в гемолитической системе позволило нам получить 50% ингибирование гемолитической активности классического пути системы комплемента пулированной сыворотки крови здоровых доноров. Дальнейшие исследования индивидуальных сывороток контрольной группы здоровых доноров в данных условиях показали, что присутствие 0,29 М NaCl подавляет гемолитическую активность системы комплемента на уровне 30—70%. Использование же 25%-ной сыворотки в гемолитическом тесте позволило исключить лимит в инкубационной пробе как гетерофильных антител, так и компонентов комплемента. Кроме того, в 25%-ной сыворотке, содержащейся в гемолитической системе, дополнительно вовлекаются в реакцию регуляторные белки системы комплемента и аутоантитела к ним, присутствующие в низких концентрациях.

Таким образом, модификация гемолитического теста за счет увеличения концентрации сыворотки, отказ от использования сенсibilизирующих антител кролика и использование «нагрузки» в виде 0,29 М NaCl в гемолитической системе позволяет выявлять функциональные сдвиги в реактивности системы комплемента на ранних, доклинических, стадиях аутоиммунных заболеваний. Наличие гиперреактивности системы комплемента свидетельствует об аутоиммунной воспалительной реакции в организме человека. Выявление данного факта может быть полезным диагностическим маркером при подготовке больных к плановым операциям с целью снижения осложнений в послеоперационном периоде. У больных с инструментально подтвержденным атеросклерозом коронарных или каротидных артерий данный показатель может иметь прогностическое значение при инфарктах и инсультах (прогноз тяжести реперфузионного синдрома). Определенные расхождения по данным КЭФГА и РСК свидетельствуют, скорее всего, о сложных регуляторных реакциях при активации системы комплемента иммунными комплексами, формирующимися при длительных хронических сенсibilизациях организма человека определенными патогенами, и требуют дальнейших фундаментальных исследований. Разработанная методика опреде-

ления реактивности системы комплемента может быть также использована как модельная система для поиска экзогенных регуляторов как системы комплемента, так и иммуноглобулинов в циркулирующих иммунных комплексах. Разработанный экспресс-способ определения РСК отличается простотой, доступностью, высокой информативностью и может быть рекомендован к внедрению в практику клинико-диагностических лабораторий практического здравоохранения для прогноза тяжести аутоиммунных воспалительных реакций.

Список литературы

1. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Меньшиков В.В., Делеторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др. / Под ред. В.В. Меньшикова. — М.: Медицина, 1987. — 368 с.
2. Шойбонов Б.Б., Хайбулин В.Р., Сониев В.М. и др. Способ определения нарушения иммунного статуса // Патент РФ № 2247381 от 27.02.2005 г. Бюл.№6.
3. Шойбонов Б.Б., Хайбулин В.Р., Панченко Л.Ф. и др. Коэффициент эффекторной функции антител (КЭФГА) — новый показатель состояния гуморального иммунитета // Патогенез. — 2011. — Т. 9, №1. — С. 43—49.
4. Шойбонов Б.Б., Хайбулин В.Р., Панченко Л.Ф. и др. Экспресс-способ определения нарушения иммунного статуса организма человека // Патент РФ №2422831 от 27.06.2011 г. Бюл.№18.
5. De Cordoba S.R., Tortajada A., Harris C.L., Morgan B.P. Complement dysregulation and disease: from genes and proteins to diagnostics and drugs // Immunobiology. — 2012. — Vol. 217. — P. 1034—1046.
6. Gros P., Milder F.J., Janssen B.J. Complement driven by conformational changes // Nat. Rev. Immunol. — 2008. — Vol. 8. — P. 48—58.
7. Janssen B.J., Huizinga E.G., Raaijmakers H.C. et al. Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity // Nature. — 2005. — Vol. 437. — P. 505—511.
8. Maeda S., Nagasawa S. Effect of sodium chloride concentration on fluid-phase assembly and stability of the C3 convertase of the classical pathway of the complement system // Biochem. J. — 1990. — Vol. 271. — P. 749—754.
9. Walport M.J. Complement. First of two parts // N. Engl. J. Med. — 2001. — Vol. 344. — P. 1058—1066.
10. Walport M.J. Complement. Second of two parts // N. Engl. J. Med. — 2001. — Vol. 344. — P. 1140—1144.

Поступила 16.07.13

Сведения об авторах:

Хайбулин Владимир Раабильевич, Медицинский центр «Дали», Москва
 Баронец Валерия Юрьевна, старш. науч. сотр. лаб. биохимии ФГБУ НИЦ наркологии Минздрава России, науч. сотр. лаб. физиологии мотиваций ФГБУ НИИИФ им. П.К. Анохина
 Панченко Леонид Федорович, д.м.н., проф., акад. РАМН, зав. лаб. биохимии ФГБУ НИИОПП РАМН
 Кубатиев Аслан Амирханович, д.м.н., проф., акад. РАМН, дир. ФГБУ НИИОПП РАМН

К.В. Котенко, Б.Б. Мороз, Т.А. Насонова, О.А. Добрынина, А.А. Липенголец,
Т.И. Гимадова, Ю.Б. Дешевой, В.Г. Лебедев, А.В. Лырщикова, И.И. Ерёмин

Экспериментальная модель тяжелых местных лучевых поражений кожи после действия рентгеновского излучения

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна», 123182, Москва, ул. Живописная, 46

Разработана экспериментальная модель тяжелых местных лучевых поражений кожи при действии относительно «мягкого» рентгеновского излучения на модифицированной установке РАП100-10 производства ООО «Диагностика-М» (Россия). Модель может быть использована в доклинических исследованиях на мелких экспериментальных животных с целью совершенствования методов лечения местных лучевых поражений, прежде всего в условиях применения клеточной терапии.

Ключевые слова: кожа, рентгеновское излучение, местные лучевые поражения, мезенхимальные стволовые клетки

K.V. Kotenko, B.B. Moroz, T.A. Nasonova, O.A. Dobrynina, A.A. Lipengolz,
T.I. Gimadova, Yu.B. Deshevoy, V.G. Lebedev, A.V. Lyrshikova, I.I. Eremin

Experimental model of severe local radiation injuries of the skin after X-rays

Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, 46, Zhivopisnay str., Moscow, 123182, Russia

The experimental model of severe local radiation injuries skin under the influence of a relatively soft X-rays on a modified device RAP 100-10 produced by «Diagnostica-M» (Russia) was proposed. The model can be used as pre-clinical studies in small experimental animals in order to improve the treatment of local radiation injuries, especially in the conditions of application of cellular therapy.

Key words: skin, X-ray, local radiation injury, mesenchymal stem cells

Местные радиационные поражения кожи наблюдаются при радиационных авариях и инцидентах с источниками ионизирующих излучений, а также как осложнения после рентгенотерапии и гамма-терапии [2, 7, 9, 10]. Консервативные методы лечения тяжелых местных лучевых поражений являются малоэффективными и нередко требуется оперативное вмешательство. Одним из перспективных методов лечения тяжелых лучевых ожогов может являться клеточная терапия, оптимальные условия применения которой требуют доклинических исследований [4, 8].

Целью работы являлась разработка экспериментальной модели тяжелых местных лучевых поражений кожи при действии относительно «мягкого» рентгеновского излучения, когда не наблюдается поражение нижерасположенных органов и тканей. В настоящее время отсутствуют облучательские установки такого типа для локального облучения мелких лабораторных животных.

Для корреспонденции: Насонова Тамара Алексеевна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр, Центра биомедицинских технологий ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России. E-mail: t.anasonova12@yandex.ru

Методика

Облучение проводилось на изготовленной по нашему заказу самозащищенной рентгеновской установке РАП100-10 производства ООО «Диагностика-М» (Россия). Рентгеновский аппарат, используемый в данной установке, способен работать при напряжении на рентгеновской трубке от 30 кВ до 100 кВ и токе трубки от 6,1 мА до 10 мА. Аппарат имеет бериллиевое выходное окно излучения.

В установке предусмотрен подъемный столик для вертикального перемещения облучаемого объекта, система коллимации излучения, позволяющая менять размер поля излучения от 5 до 50 мм на расстоянии 100 мм от излучателя, лазерный указатель центра поля излучения и цифровая видеокамера для наблюдения за животным в процессе облучения (рис. 1 на 2-й странице обложки).

Дозиметрические характеристики установки исследовались с помощью фантома, состоящего из сборки тонких термомюлюминесцентных детекторов ТГЛД-580 [3] и прокладок из фторопласта общей толщиной 30 мм, помещенной в плексигласовый цилиндр. Облучение фантома производилось при напряжении на трубке 30 кВ, токе трубки 6,1 мА, с алюминиевым филь-

тром толщиной 0,1 мм в течение 60 с. Расстояние от источника излучения до поверхности сборки составляло 9 см. Результаты измерений приведены на рис. 2.

При таких условиях облучения в дозе 110 Гр (алюминиевый фильтр 0,1 мм) по расчетным данным доза рентгеновского излучения на глубине 2 мм порядка 30 Гр, а на глубине 5—10 мм — не более 10 Гр.

Излучение коллимировалось таким образом, чтобы создать на поверхности кожи животных однородное круглое поле излучения диаметром 3,2 см. Размер поля и его однородность контролировались при помощи дозиметрических пленок Gafchromic XR-RV2. Животных облучали в течение 380 с до достижения дозы на поверхности кожи 110 Гр (мощность дозы — 17,3 Гр/мин).

Эксперименты проведены в весенне-осенний период на 70 крысах-самцах породы Вистар массой 180—200 г.

Во время облучения животных фиксировали в специальном станке на животе. Локальное облучение кожи животных в области спины проводили после удаления шерсти, площадь облучения — 8,2—8,5 см². Тяжесть течения лучевого поражения кожи оценивали по клиническим изменениям участка облучения и с помощью планиметрических методов, позволяющих измерять площадь пораженного участка кожи в динамике. Для проведения измерений производили фотосъемку лучевой язвы цифровой фотокамерой Canon. Площадь лучевого поражения кожи рассчитывали с помощью компьютерной программы AutoCad 14.

Результаты и обсуждение

Клинические наблюдения и результаты измерения площади поражения свидетельствуют о том, что выбранная нами доза рентгеновского излучения 110 Гр (Al фильтр 0,1 мм) вызывает тяжелые и длительно незаживающие язвы кожи у крыс. Так, у 89% крыс на 60-е сутки площадь лучевого поражения кожи составляла более 1,0 см², а у 45% животных оставалась таковой вплоть до 120-х суток.

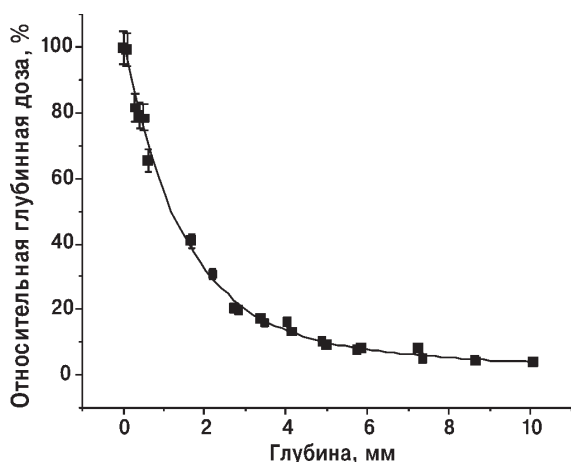


Рис. 2. Относительная глубинная доза в тканезквивалентном фантоме

Клиническая картина течения лучевого поражения кожи крыс, облученных в дозе 110 Гр, развивалась по обычному сценарию [1]. Латентный период, когда визуально не определялось поражение кожи, длился 7—9 сут. Затем появлялась гиперемия, но не у всех животных, нарушался нормальный тонус кожи. На 12—13-е сутки после облучения у крыс регистрировали проявления сухого дерматита. К 14—16-м суткам сухой дерматит переходил во влажный. Через 17—25 суток после облучения на коже крыс начинали образовываться язвы, представляющие собой слившиеся очаги с серозно-геморрагическим отделяемым, быстро ссыхающимся в тонкие коричневые корочки. В последующем эти корочки становились все грубее, образовывался струп темно-коричневого цвета. Далее происходило либо заживление язвы с образованием атрофического рубца, либо течение патологического процесса приобретало хроническое течение, в нашем случае, на 120-е сутки после облучения у 45% животных площадь язв была более 1,0 см².

Следует отметить, что течение лучевого ожога кожи у крыс характеризовалось индивидуальными особенностями. На рис. 3 (3-я страница обложки) представлена динамика развития лучевого ожога кожи у крыс с хроническим течением язвы (крыса 35) и с заживлением язвы к 90-м суткам (крыса 41).

Модифицированный рентгеновский аппарат РАП100-10 позволяет менять режим облучения и в зависимости от поставленных задач облучать кожу лабораторных животных, вызывая лучевые поражения кожи от легких до крайне тяжелых, что может наблюдаться в клинической практике.

Клинические наблюдения за животными, облученными в высоких дозах и при разной проникающей способности излучения, позволили выявить некоторые особенности течения язвенного процесса у крыс. Так, у крыс, облученных в дозах 126 Гр (Al фильтр 0,17 мм), 185 Гр (Al фильтр 0,05 мм) и 225 Гр (без фильтра), на 8—15-е сут. лучевые поражения кожи были своеобразными — эпидермис визуально напоминал «сухую лимонную корку», под ним тонкий гладкий сухой слой кожи с выраженной инъекцией сосудов. Типичные кожные язвы у крыс, облученных в дозах 185 Гр и 225 Гр, развивались только к 40—50-м суткам после облучения. Крысы, облученные в дозе 126 Гр с использованием Al фильтра толщиной 0,17 мм (самое «жесткое» излучение из перечисленных выше), пали на 21—24-е сут. с признаками поражения кишечника. Язв кожи до гибели животных не было.

После облучения крыс в дозах от 40 до 70 Гр, как с использованием алюминиевых фильтров (от 0,05 до 0,17 мм), так и без фильтров, у всех животных поражение кожи было поверхностным, и язвы заживали с образованием атрофического рубца к 40—60-м суткам.

Заключение

Таким образом, данные дозиметрического исследования, клинические наблюдения и планиметрические измерения показали, что облучение животных на модифицированном рентгеновском аппарате РАП100-10 в дозе 110 Гр с алюминиевым фильтром 0,1 мм является оптимальным режимом радиационного воздействия, который приводит к тяжелым и длительно текущим местным лучевым поражениям кожи у крыс. Эта модель может быть использована для совершенствования патогенетической терапии местных лучевых поражений кожи, прежде всего, в условиях применения клеточной терапии [4—6, 11—14].

Список литературы

1. *Африканова Л.А.* Острая лучевая травма кожи. — М.: Медицина, 1975. — 192 с.
2. *Бушманов А.Ю., Надежина Н.М., Нугис В.Ю., Галстян И.А.* Местные лучевые поражения кожи человека: возможности биологической индикации дозы (аналитический обзор) // Мед. радиол. и рад. безопасность. — 2005. — Т. 50, №1. — С. 37—47.
3. *Гимадова Т.И., Мартынюк А.Н., Федотов Ю.А.* и др. Пленочные термолюминесцентные детекторы для лучевой терапии и радиобиологии // Медицинская физика. — 2008. — №2. — С. 76—77.
4. *Котенко К.В., Мороз Б.Б., Надежина Н.М.* и др. Трансплантация мезенхимальных клеток при лечении лучевых поражений кожи // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2011. — №1. — С. 2—7.
5. *Котенко К.В., Еремин И.И., Мороз Б.Б.* и др. Клеточные технологии в лечении радиационных ожогов: опыт ФМБЦ им. А.И. Бурназяна // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2012. — Т. 7, №2. — С. 97—102.
6. *Мороз Б.Б., Опищенко Н.А., Лебедев В.Г.* и др. Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на течение местных лучевых поражений у крыс после локального β -облучения // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2009. — Т. 49, №6. — С. 688—693.
7. *Надежина Н.М., Филлин С.В., Сачков А.В., Галстян И.А.* Острые местные лучевые поражения и их последствия (нештатная ситуация при дефектоскопических работах) // Медицина труда и промышленная экология. — 2004. — №3. — С. 40—43.
8. Положения о проведении клинических исследований стволовых клеток (3 декабря 2008 г.). Международное общество по исследованию стволовых клеток (ISSCR) // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2008. — Т. 3, №4. — С. 73—85.
9. Радиационная медицина: Руководство для врачей-исследователей и организаторов здравоохранения / Под ред. Л.А. Ильина — М.: ИздАТ, 2001. — Т. 2. — 432 с.
10. *Селидовкин Г.Д.* Медицинская помощь при радиационной аварии с источником цезия-137 в Бразилии (1987) // Медицинские аспекты аварии на Чернобыльской атомной станции. — Киев: Здоровье, 1988. — С. 180—185.
11. *Ai G., Su Y., Yan G.* et al. The experimental study of bone marrow mesenchymal stem cells on the repair of skin wound combined with local radiation injury // Zhonghua Yi Xue Za Zhi. — 2002. — Vol. 82(23). — P. 1632—1636.
12. *Francois S., Mouisseddine M., Bensidhoum M.* et al. Human mesenchymal stem cells favour healing of the cutaneous radiation syndrome in a xenogenic transplant model // Annals of Hematology. — 2007. — Vol. 86 (1). — P. 1—8.
13. *Kataoka K., Medina R.J., Kageyama T., Miyazaki M., Yoshino T., Makino T., Huh N.H.* Participation of adult mouse bone marrow cells in reconstitution of skin // Am. J. Pathol. — 2003. — Vol. 163(4). — P. 1227—1231.
14. *Otto W.R., Wright N.A.* Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic // Fibrogenesis & Tissue Repair. — 2011. — 4. — P. 20 doi:10.1186/1755-1536-4-20

Поступила 10.10.13

Сведения об авторах:

- Котенко Константин Валентинович*, д-р мед. наук, проф., Генеральный директор ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России
- Мороз Борис Борисович*, д-р мед. наук, проф., академик РАМН, зав. лаб., ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России
- Насонова Тамара Алексеевна*, канд. мед. наук, вед. науч. сотр., ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России
- Добрынина Ольга Александровна*, науч. сотр., ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России
- Липенгольц Алексей Андреевич*, канд. физ.-мат. наук, старш. науч. сотр., ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России
- Гимадова Тамара Ивановна*, старш. науч. сотр., ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России
- Дешевой Юрий Борисович*, канд. мед. наук, вед. науч. сотр., ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России
- Лебедев Владимир Георгиевич*, канд. биол. наук вед. науч. сотр., ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России
- Лырищикова Алла Васильевна*, канд. биол. наук, старш. науч. сотр. ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России
- Еремин Илья Игоревич*, канд. мед. наук, зав. лаб., ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

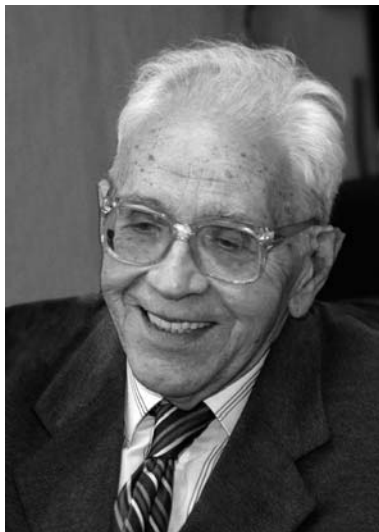
Борис Борисович Мороз (к 85-летию со дня рождения)

Исполнилось 85 лет главному редактору журнала «Патологическая физиология и экспериментальная терапия», известному патофизиологу и радиобиологу, доктору медицинских наук, профессору, академику РАНН Борису Борисовичу Морозу.

Б.Б. Мороз окончил с отличием лечебный факультет 1-го Московского медицинского института им. И.М. Сеченова, аспирантуру в институте биофизики МЭ СССР. В 1952 г. он защитил кандидатскую, а в 1967 г. докторскую диссертацию. Борис Борисович работал заведующим отделом, был заместителем директора «Института биофизики». В настоящее время работает в Федеральном медицинском биофизическом центре им. А.И. Бурназяна, является заведующим лабораторией радиационной патологии. В 1978 г. избран членом-корреспондентом, в 1988 г. — академиком АМН СССР.

Основные научные труды Б.Б. Мороза посвящены патогенезу радиационных поражений, вызванных внешним и внутренним облучением, им описаны изменения в органах и системах и раскрыты некоторые механизмы их развития при действии на организм инкорпорированного высокотоксичного радионуклида полония-210.

При исследовании механизмов, лежащих в основе развития желудочно-кишечного синдрома при острой лучевой болезни установлены закономерности нарушения процессов всасывания и переваривания, разработана схема полного парентерального питания для клинических условий. Под руководством Б.Б. Мороза установлены механизмы развития пострadiационного гиперкортицизма и роль глюкокортикоидов в течении лучевой болезни. Изучалось значение эмоционального стресса в связи с проблемой радиационной безопасности, доказан факт суммирования повреждающих эффектов и снижение эффективности радиопротекторов при комбинированном воздействии на организм ионизирующей радиации и эмоционального перенапряжения. Показано, что применение анксиолитиков устраняло негативное влияние выраженного эмоционального стресса. Экспериментально обосновано представление о регулирующей роли эндогенных глюкокортикоидов в процессах рециркуляции стволовых кроветворных клеток, показано, что глюкокортикоиды в малых дозах оказывают влияние на миграцию и рециркуляцию кроветворных стволовых клеток



через систему Т-лимфоцитов. Обнаружено, что мезенхимальные стволовые клетки усиливают регенеративные процессы при местном лучевом поражении.

Б.Б. Мороз пользуется заслуженным авторитетом требовательного и чуткого воспитателя научных кадров. К числу учеников Бориса Борисовича причисляют себя не только аспиранты и научные работники, прошедшие школу под непосредственным его руководством, но и многие из тех, кому он открыл дорогу в науку, подсказал верный выбор в научном поиске, поддержал и воодушевил не только добрым советом, но и своим обаянием высокоинтеллектуального человека.

На протяжении многих лет Б.Б. Мороз вел большую работу на посту заместителя Всесоюзного, а затем Российского научного общества патофизиологов (1970—2000 г.), ученого секретаря и заместителя ответственного редактора отдела «Патологическая физиология» Большой медицинской энциклопедии (1969—1990 г.), заместителя главного редактора спецжурнала (1964—1990 г.). С 1984 г. он является главным редактором журнала «Патологическая физиология и экспериментальная терапия» — главного печатного органа патофизиологии.

Особо следует отметить бережное и необычайно внимательное отношение Б.Б. Мороза к научным работам, представляемым в печать из самых разных регионов страны. Имея большой опыт редакционной работы, Борис Борисович уделяет огромное внимание тщательному анализу и обсуждению материала, что в большинстве случаев позволяет кардинально улучшить качество работ, обнаружить в них новые оригинальные стороны и помочь автору исследования правильно оценить собственный материал.

Борис Борисович награжден Орденом трудового красного знамени (1966 г.), Орденом почета (1998 г.), медалями, нагрудными знаками отличия «Ветеран атомной энергетики и промышленности» (2006 г.), Золотым крестом ФМБА России (2012 г.) и другими наградами.

Коллеги, друзья и ученики от всей души поздравляют Бориса Борисовича с юбилеем, желают здоровья, благополучия и новых творческих удач.

Игорь Сергеевич Гуцин (к 75-летию со дня рождения)

Исполнилось 75 лет со дня рождения видного отечественного ученого в области патофизиологии и аллергологии, члена-корреспондента РАМН, профессора Игоря Сергеевича Гуцина.

В 1961 г. Игорь Сергеевич с отличием окончил 2-й Московский медицинский институт им. Н.И. Пирогова. Будучи еще студентом, он начал исследовательскую работу на кафедре патофизиологии под руководством академика АМН СССР Андрея Дмитриевича Адо и в последующем стал одним из его ближайших сотрудников, учеников и последователей. По материалам исследований, выполненных в студенческом научном кружке, им были опубликованы две работы в центральной научной печати, представлен доклад на международной конференции по гистамину (Варшава, 1962 г.), получивший высокую оценку. С момента организации Научно-исследовательской аллергологической лаборатории АМН СССР (1961 г.) И.С. Гуцин был зачислен в нее младшим научным сотрудником и работал там до 1979 г. В 1963 г. он защитил кандидатскую, а в 1970 г. — докторскую диссертацию. В 1974 г. работал на кафедре фармакологии Каролинского медицинского института (Стокгольм, Швеция) у профессора Борье Увнаса. Там И.С. Гуцин выполнил две оригинальные экспериментальные работы, по материалам которых были опубликованы статьи в центральных зарубежных научных журналах. В 1979 г. он организовал и возглавил лабораторию клинической иммунологии 4-го Главного управления при Минздраве СССР, а в 1980 г. получил приглашение в только что созданный Институт иммунологии (сейчас — ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России), где и работает по настоящее время заведующим отделом аллергологии и клинической иммунологии.

Вся научная деятельность И.С. Гуцина связана с аллергологией, общей патофизиологией, иммунологией. Он внес весомый фундаментальный вклад в развитие этих областей медицинских знаний. Им установлена роль гипоталамуса в механизме ложных аллергических реакций; доказано прямое активирующее действие аллергена на сенсibilизированные гладкомышечные и миокардиальные клетки, получившее подтверждение спустя много лет (в 2005 г.), ког-



да были обнаружены на гладких мышцах высокоаффинные рецепторы для IgE ($F_{c\epsilon}RI$); совместно с Ю.С. Свердловым выявлен пресинаптический механизм исчезновения постсинаптического торможения при столбняке; разработана теория нецитотоксического вовлечения в аллергический ответ клеток-мишеней; изучена пассивная анафилаксия гладких мышц человека; установлено антимицинподобное действие папаверина; обнаружены не известные ранее гистаминвысвобождающие пептиды ядов перепончатокрылых и показано их участие в токсических и аллергических реакциях; обнаруже-

ны аллергенспецифические клетки-киллеры; обоснованы новые принципы создания модифицированных лечебных аллергенов; разработан новый терапевтический способ, состоящий в экстракорпоральной индукции фармпрепаратами регуляторных клеток с последующим возвращением их в организм хозяина — экстракорпоральная иммунофармакотерапия, использованная для лечения больных с острыми токсикоаллергическими реакциями, атопическим дерматитом, бронхиальной астмой; обосновано создание полифункциональных противоаллергических средств, оказывающих антимиediatorное действие и одновременно тормозящих активность клеток-мишеней аллергии; продемонстрирована возможность инактивации функции IgE моновалентными Fab-фрагментами анти-IgE-антител; разработана система индивидуального выбора оптимальных по фармакокинетическим свойствам обратных агонистов H1-рецепторов; показана вненейрональная функция ацетилхолина при аллергии; обоснована и разработана проблема патологии гистогематических барьеров как формы предрасположенности к аллергии; обосновано представление об аллергическом ответе как новом эволюционном приобретении в виде аллергенспецифического воспаления, неизбежно возникающего в ответ на поступление в организм аллергенов; поставлена проблема нежелательных последствий устранения аллергической реактивности для высокоорганизованных видов животных и пр. Отличительной чертой И.С. Гуцина является умение увидеть за частными явлениями общепатологические закономерности. Основные итоги его исследовательской деятельности получили всеобщее

признание и заняли важное место в формировании современных представлений о механизмах аллергии.

И.С. Гуцин — автор около 400 печатных научных работ, шести монографий, посвященных актуальным проблемам аллергологии, разделов в различных руководствах и учебниках, имеет 13 патентов и авторских свидетельств на изобретения.

И.С. Гуцин в совершенстве владеет лекторским искусством, охотно помогает молодым ученым в выборе научного пути, обсуждении результатов исследований, подготовке научных публикаций. Большое внимание И.С. Гуцин уделяет систематической подготовке молодых научных кадров. Им подготовлены 4 доктора и 28 кандидатов наук, многие из его учеников возглавляют научные коллективы.

И.С. Гуцин проводит большую научно-организационную и общественную работу. Он является вице-президентом Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов, председателем проблемной комиссии «Аллергология и клиническая иммунология» РАМН, членом Европейской академии аллергологии и клинической иммунологии, Европейского общества по исследованию гистамина, членом дис-

сертационного совета, экспертом научно-технической сферы ФГБНУ НИИ РИНКЦЭ, заместителем главного редактора журнала «Патологическая физиология и экспериментальная терапия», членом редколлегии журналов «Иммунология», «Пульмонология», «Российский аллергологический журнал», «Russian Journal of Immunology» и др. Многолетняя работа И.С. Гуцина в составе редколлегии журнала «Патологическая физиология и экспериментальная терапия», конкретные, доброжелательные и аргументированные советы авторам статей вносят важный вклад в повышение научного уровня публикаций.

Редколлегия журнала «Патологическая физиология и экспериментальная терапия», друзья, ученики и коллеги поздравляют Игоря Сергеевича Гуцина с юбилеем и желают ему крепкого здоровья, благополучия и многих лет плодотворной научной деятельности.

Николай Николаевич Петрищев (к 75-летию со дня рождения)

Исполнилось 75 лет заслуженному деятелю науки Российской Федерации, профессору кафедры патофизиологии, доктору медицинских наук Николаю Николаевичу Петрищеву.

Н.Н. Петрищев является одним из ведущих специалистов в области патофизиологии микроциркуляции, гемостаза и лазерной медицины. Под его руководством получены новые данные о механизмах тромборезистентности сосудов, выявлены типовые нарушения тромбогенных свойств сосудов при различных патологических процессах, обосновано положение о роли дисфункции эндотелия при различной патологии сердечно-сосудистой системы и других заболеваниях. Отличительными чертами Николая Николаевича являются оригинальность научных идей в сочетании с научной прозорливостью, а также его открытость, готовность к сотрудничеству.

Исследования профессора Н.Н. Петрищева, проводимые совместно с сотрудниками клинических кафедр, послужили основой для совершенствования методов диагностики и коррекции нарушений микроциркуляции и гемостаза при ряде заболеваний. Он является автором 350 научных и методических работ, 4 изобретений, награжден памятной медалью «Автору научного открытия» и дипломом Президиума РАЕН, одним из первых патофизиологов в России удостоен «медали В.В. Пашутина». Успешному развитию научных исследований способствует серьезное техническое переоснащение им лабораторий кафедры. Традиционным для кафедры стало тесное взаимодействие с НИИ Санкт-Петербурга, а также с научными учреждениями других городов. Н.Н. Петрищев является руководителем Центра лазерной медицины, в котором проводится усовершенствование и разработка клиничко-экспериментальных методов исследо-



вания взаимодействия лазерного излучения с тканями организма. Под его руководством подготовлено 16 докторов и 34 кандидата наук. Н.Н. Петрищев является основателем (2002 г.) и главным редактором журнала «Регионарное кровообращение и микроциркуляция», а также членом редколлегии четырех научных журналов.

Научно-исследовательская и организационная деятельность Н.Н. Петрищева получили признание научной общественности. Н.Н. Петрищев является членом правления Российского общества патофизиологов, членом Международного общества патофизиологов, председателем Российской секции Европейского общества микроциркуляции. С 1977 г. по февраль 2013 г. он был бессменным председателем правления Санкт-Петербургского общества патофизиологов. Н.Н. Петрищев — заслуженный деятель науки РФ, заслуженный работник Высшей школы РФ, академик Международной академии высшей школы, академик Российской академии естественных наук, награжден знаком «Отличник высшей школы» и медалью «За трудовую доблесть».

Сотрудники Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова сердечно поздравляют Николая Николаевича с юбилеем.

Редакционная коллегия журнала присоединяется к поздравлениям и желает юбиляру дальнейших творческих успехов.

Правила оформления статей для публикации в журнале «Патологическая физиология и экспериментальная терапия»

1. Статьи, оформленные без соблюдения указанных правил, к рассмотрению не принимаются.

2. Все присланные работы обязательно проходят этап научного рецензирования, редакция оставляет за собой право сокращения публикуемых материалов и адаптации их к рубрикам журнала.

3. В редакцию направляются 2 экземпляра рукописи, которые сопровождаются 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 редколлективом 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».