

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.jppt.net
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.

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

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.

ИФРИНЦ 0,413

Журнал включен в базу данных Scopus

Журнал «Патологическая физиология и экспериментальная терапия» индексируется в следующих иностранных изданиях: *PubMed; Medline; 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*

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

ISSN 0031-2991
Патологическая физиология и экспериментальная терапия.
2014. №1. 1—92.

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 «Издательство «Гениус Медиа», 2014.

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

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

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

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

№1, 2014
ЯНВАРЬ—МАРТ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор Б.Б. Мороз

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

Редакционный совет

Ю.В. Баякин (Москва), Ю.Ю. Бяловский (Рязань),
Ф. Дауни (США), 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), В. Шварц (Германия),
А.П. Ястребов (Екатеринбург)

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Орлов А.А., Сабурин И.Н., Сысоев С.Д., Григорьян А.С.** Влияние трансплантации аутогенных мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани на течение остеогенетического процесса (экспериментальное исследование) 3
- Митичкина Е.В., Морозов С.Г., Захарова И.А., Волкова Е.Н., Елистратова И.В.** Лейкоцитарная эластаза, альфа 1-протеиназный ингибитор и С-реактивный белок у пациентов с замедленной негативацией серологических реакций после лечения ранних форм сифилиса 8
- Сергеева С.П., Литвицкий П.Ф., Бреславич И.Д., Гуляев М.М.** Изменение соотношения уровней растворимых TNF- α и TNF-R1 в крови как одно из ключевых звеньев патогенеза, диагностический и прогностический показатель при ишемическом инсульте 13
- Шакова Ф.М., Клодт П.М., Кудрин В.С., Давыдова Т.В., Романова Г.А.** Влияние антител к глутамату на содержание моноаминов в структурах мозга крыс после фотохимического ишемического повреждения префронтальной коры 18
- Лычева Н.А., Шахматов И.И., Вдовин В.М., Киселёв В.И.** Устранение активирующего влияния психоэмоционального стресса на гемостаз действием мягкой гипотермии 24
- Баранов М.В., Архипова Е.Н., Лебедева М.А., Хлебникова Н.Н., Медведева Ю.С.** Особенности фармакокинетики цефтриаксона в условиях антиортоstaticкой гипокинезии у крыс 28
- Степанова М.А., Архипова Е.Н., Медведева Ю.С., Крганов М.Ю., Эскина Э.Н.** Роль изменений субфракционного состава слезной жидкости в оценке повреждающего действия мягких контактных линз и эксимерлазерной абляции роговицы при коррекции аметропий 32
- Смирнова Е.А., Терехина О.Л., Мациевский Д.Д., Антипова Т.А., Кобозева Л.П., Мичунская А.Б., Поздняков О.М., Круглов С.В., Бахтина Л.Ю., Белкина Л.М.** Влияние аллоксанового диабета на функцию сердечно-сосудистой системы и перекисное окисление липидов у крыс разных генетических линий 37
- Васильева Н.Н., Брындина И.Г., Протасова С.В., Бутолин Е.Г.** Сурфактантная система легких при аллоксановом диабете у крыс с различной устойчивостью к стрессу 44
- Пруткина Е.В., Сепп А.В., Цыбиков Н.Н.** Ферменты азурофильных гранул нейтрофилов и матриксная металлопротеиназа-2 как маркеры стадий развития экспериментального респираторного дистресс-синдрома 48
- Дашинамжилов Ж.Б., Туртуев Ц.Д.** Фармакотерапевтическая эффективность экстракта сухого «Сэ-год -5» при повреждении печени четыреххлористым углеродом у белых крыс 53

ОБЗОРЫ

- Гущин И.С.** Эволюционное предупреждение: аллергия 57
- Кукушкин М.Л., Игонькина С.И.** Значение ГАМК в патогенезе болевых синдромов 68
- Маслов Л.Н., Барзах Е.И., Лишманов А.Ю., Горбунов А.С., Цибульников С.Ю., Семенов А.С.** Агонисты опиоидных рецепторов могут усугублять ишемические и реперфузионные повреждения сердца 79
- Шварц В.** Синдром хронического воспаления жировой ткани 86

ЮБИЛЕЙ

- Еникеев Дамир Ахметович** (к 75-летию со дня рождения) 91

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- Orlov A.A., Saburina I.N., Sisoiev S.D., Grigorian A.D.** Influence of transplantation of autogenic mezenhymal stem cells from the fatty tissues on osseogenic process (experimental research) 3
- Mitichkina E.V., Morozov S.G., Zakharova I.A., Volkova E.N., Elistratova I.V.** Leukocyte elastase, alpha 1-proteinase inhibitor and C-reactive protein in patients with delayed negativation of serological reactions after treatment of early syphilis 8
- Sergeeva S.P., Litvickiy P.F., Breslavich I.D., Gulyaev M.M.** The changes of plasma levels of soluble TNF- α and TNF-R1 ratio is a prognostic marker and key element of the stroke pathogenesis 13
- Shakova F.M., Klodt P.M., Kudrin V.M., Davydova T.V., Romanova G.A.** The influence of glutamate antibodies on the level of neurotransmitter monoamines in brain structures of rats with ischemic damage of prefrontal cortex 18
- Lycheva N.A., Shahmatov I.I., Vdovin V.M., Kiselev V.I.** Elimination of the activating influence of emotional stress on hemostasis mild hypothermia action 24
- Baranov M.V., Arkhipova E.N., Lebedeva M.A., Khlebnikova N.N., Medvedeva Yu.S.** Features of the pharmacokinetics of ceftriaxone during the antiorthostatic hypokinesia in rats 28
- Stepanova M.A., Arkhipova E.N., Medvedeva Yu.S., Karganov M.Yu., Eskina E.N.** The role of changes in the subfractional compound of tear fluid in the assessment of damaging effect from soft contact lenses and the excimer laser ablation of the cornea 32
- Smirnova E.A., Terekhina O.L., Matzievski D.D., Antipova T.A., Kobozeva L.P., Michunskaya A.B., Pozdnyakov O.M., Kruglov S.V., Bakhtina L.Yu., Belkina L.M.** Effect of the alloxane diabetes on the cardio-vascular system function and lipid peroxidation in rats of different genetic strains 37
- Vasiljeva N.N., Bryndina I.G., Protasova S.V., Butolin E.G.** Surfactant system of lung in rats with different resistance to stress under alloxan diabetes 44
- Prutkina E.V., Sepp A.V., Tsybikov N.N.** Enzymes of azurophilic neutrophil granules and matrix metalloproteinase-2 as markers of the developmental stages of experimental respiratory distress syndrome 48
- Dashinamzhirov Zh.B., Turtuev C.D.** Pharmacotherapeutical efficiency of the dry extract «Ce-god-5» in liver injury induced by CCl₄ in white rats 53

REVIEWS

- Gushchin I.S.** Evolutionary admonition: allergy 57
- Kukushkin M.L., Igonkina S.I.** Significance of GABA in pain syndrome pathogenes 68
- Maslov L.N., Barzakh E.I., Lishmanov A.Yu., Gorbunov A.S., Tsybulnikov S.Yu., Sementsov A.S.** Agonists of opioid receptors may aggravate ischemic and reperfusion damages of the heart 79
- Schwarz V.** The syndrome of chronic inflammation of adipose tissue 86

ANNIVERSARY

- D.A. Enikeev** (75 years) 91

© Коллектив авторов, 2014
УДК 616-092

А.А. Орлов, И.Н. Сабурина, С.Д. Сысоев, А.С. Григорьян

Влияние трансплантации аутогенных мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани на течение остеогенетического процесса (экспериментальное исследование)

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

На 48 крысах Вистар с помощью гистоморфологического метода прослежена динамика остеогенетического процесса в области аутокостного трансплантата из большеберцовой кости при его фиксации на поверхности нижней челюсти и введении в область операции взвеси из аутогенных стволовых клеток из жировой ткани в первой группе животных (основная группа), и без введения МСК во второй группе (группе сравнения). Сроки наблюдений: 21, 60, 120 и 180 суток, по 6 крыс на точку наблюдений в каждой из групп. Проведенное исследование продемонстрировало выраженную интенсификацию остеогенетического процесса в основной группе опыта, и как следствие этого, слияние костных образований в единое целое. В группе сравнения во все сроки наблюдений между аутокостным трансплантатом и нижнечелюстной костью обнаруживались обширные поля грубоволокнистой соединительной ткани.

Ключевые слова: аутогенные стволовые клетки из жировой ткани, стимуляция остеогенеза, костный аутоотрансплантат

A.A. Orlov, I.N. Saburina, S.D. Sisoev, A.D. Grigorian

Influence of transplantation of autogenic mezenhymal stem cells from the fatty tissues on osseogenic process (experimental research)

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

In experiments on 48 rats of line Wistar, divided at 2 groups (first — basic group and 2-d group — group of comparison) through the use of morphological method was researched influence of mesenchymal stem cells (MSC) inoculated in the arrear of autogenic bone graft from tibia fixed at the surface of the jaw. The animals of group of comparison didn't get MSC. Time frames of watching: 21, 60, 120 and 180 days, 6 rats on the point of experiment in either of the two of the group. Data of this research had shown the intensification of bone formation process in the basic group of experiment under the action of the inoculation of autogenic MSC from adipose tissue, and as consequence of it, in eventual, merge of bone formations in a single entity.

Key words: Autogenic mezenchymal cells from an adipose tissue, stimulation bone formation, osseo genesis, bone graft

Одной из актуальных проблем современной теоретической и клинической медицины является развитие новых наукоемких лечебных технологий, к числу которых, несомненно, относятся методы, основанные на применении клеточных технологий.

С тех пор, как А.Я. Фриденштейн с соавторами [3] описали мезенхимальные стволовые клетки (МСК) костного мозга человека, которые рассматриваются как основные источники клеточного пула для постоянного обновления и регенерации костной ткани, наука прошла значительный путь развития. Решающим вкладом в развитие этого направления исследований явились работы, продемонстрировав-

шие образование эктопических очагов костеобразования и существенное ускорение процесса заживления обширных костных дефектов при инокуляции животным МСК [3, 7, 9].

За минувшее время клеточные технологии шагнули далеко вперед. Были разработаны новые методы и источники получения стволовых клеток, в том числе из жировой ткани, что актуально в свете настоящего исследования.

Если в прошлом чуть ли не единственным источником для МСК признавался костный мозг, то в последние годы речь идет о том, что МСК располагаются практически во всех тканевых субстратах взрос-

лого человека и животных. Они обнаружены и выделены из жировой ткани, скелетных мышц, связок, из трабекулярной кости [2, 4, 6].

Эти данные в определённой степени поддерживают концепцию существования мультилинейарного резерва в виде стволовых клеток на протяжении постнатальной жизни человека и животных [1, 2, 5].

Раскрыты тонкие (на молекулярном уровне) механизмы работы МСК и тех взаимодействий, которые осуществляются при их непосредственном участии [5, 6, 8, 10].

Проведенное нами исследование направлено на решение принципиально важных задач современной травматологии и ортопедии, разработку средств и методов стимуляции остеогенетического процесса при дефиците костной ткани, в том числе в области альвеолярного отростка челюсти, что актуально для ортопедической стоматологии.

Цель исследования: совершенствование средств и методов лечения дефицита костной ткани в области альвеолярного отростка посредством использования липогенных МСК и костного аутоотрансплантата.

Методика

Задачи исследования:

1. Исследовать с помощью гистоморфологического метода динамику развития костеобразовательного процесса в области трансплантации подопытным животным (крысы) аутоотрансплантата из большеберцовой кости на поверхность нижней челюсти при инокуляции им в область операции аутогенных МСК из жировой ткани.

2. Рассмотреть на основе результатов собственных наблюдений степень влияния инокуляции МСК на активность клеточных элементов участвующих в остеогенетическом процессе.

3. Исследование характера и выраженности таких компонент регенерации как пролиферация остеогенных клеток и их созревание, а также процессов резорбции костного вещества, и перехода структуры костного матрикса от грубоволокнистого характера к пластинчатому в условиях проводимого эксперимента.

4. Проследить в сроки от 21 до 180 суток характер процессов новообразования и ремоделирования вновь образованной костной ткани при введении подопытным животным липогенных МСК в области трансплантации подопытным животным костного аутоотрансплантата при инокуляции им в область операции аутогенных МСК из жировой ткани.

5. Экспериментально обосновать целесообразность и эффективность применения в клинике ортопедической стоматологии аутогенных МСК из жировой ткани на этапах подготовки пациентов к дентальной имплантации.

При анализе гистологических картин мы стремились провести оценку костеобразовательного процесса в области контакта аутокостного материала и материнской кости посредством определения интенсивности костеобразовательного процесса по:

- активности образования новых костных трабекул;
- гистологической характеристике остеобластов (с точки зрения проявления их функциональной активности);
- по наличию напластований новообразованных костных трабекул на костные фрагменты, как проявление остеогенетической активности;
- по степени зрелости новообразованных костных структур на этапах экспериментальных наблюдения.

Выделение МСК жировой ткани. Образцы жировой ткани выделяли из паховой области животных, гомогенизировали и разводили втрое фосфатным буфером Дульбекко (ФБД) и интенсивно встряхивали на вортексе в течение 2—3 мин. После центрифугирования (10 мин при 600g) жировое кольцо и супернатант удаляли, а осадок из стромальных клеток ресуспендировали в среде культивирования.

Клеточные суспензии разводили вдвое фосфатным буфером Дульбекко (ФБД) и насливали на градиент плотности Histopaque 1.077 («Sigma»).

После центрифугирования в течение 30 мин при 400g интерфазные мононуклеарные кольца отбирали в отдельные пробирки и отмывали центрифугированием в избытке ФБД. Полученные клеточные осадки ресуспендировали в среде культивирования и высевали во флаконы (T25; «Coming») [2].

Культивирование МСК жировой ткани. Среду с неприкрепившимися клетками удаляли, культуры бережно отмывали ФБД и заменяли среду культивирования на свежую. Дальнейшие смены среды проводили через 2—3 сут. По мере роста и достижения субконфлюентного состояния клетки снимали трипсином-ЭДТА («Gibco») и пересевали в новые флаконы с разведением 1:3—1:10. Использовали культуры 3—7 пассажей [2].

Методика эксперимента. Эксперимент был проведен на крысах Вистар массой 200—220 г. Животных разделили на 2 равные группы: основную группу и группу сравнения.

Способ введения МСК: 1-е введение в день операции посредством инъекции в область операции, 2-е введение — на 10-е сутки после операции, область операция обкальвали в 4-х точках.

Количество МСК на 1 введение на крысу составляло $3,5-6,7 \times 10^6$ в 0,4 мл физиологического раствора.

Первый хирургический этап

Забор аутоотрансплантата из правой большеберцовой кости (Tibia). Наркоз: кетамин с ксилазином (1:1

по объему в одном шприце) из расчета 0,15 мл препарата на 100 г массы животного. Операционное поле освобождали от шерсти. Производили разрез по передней поверхности голени от дистальной части симфиза коленного сустава над Tibia длиной приблизительно 1,5 см. Далее — рассечение футлярно-надкостничной перемычки верхней трети Tibia. Производили скелетирование участка кости 2×2 мм фрезой с охлаждением (физраствор) на глубину 1,5 мм. Выпиливали участок кости (аутотрансплантат). Костный дефект в Tibia пломбировали хирургическим воском BONEWAX фирмы Ethicon.

Аутотрансплантат помещали в стерильный физиологический раствор. Рану послойно ушивали (Викрил 5,0). По ходу операции проводили гемостаз.

Второй хирургический этап

На втором этапе производили пересадку свободного аутотрансплантата Tibia на наружную поверхность тела и ветви нижней челюсти с его фиксацией титановым микровинтом (L 5 м, D 1,2 мм).

Проводили разрез кожи и подкожно-жировой клетчатки по краю тела нижней челюсти слева. Тупым путем отводили в стороны поверхность и глубоко лежащие сосуды. Далее расслаивали жевательную мышцу, скелетировали наружную поверхность области тела и ветви нижней челюсти и производили остеопластику в этой области размером 3×3 мм. Создавали перфорационное отверстие в кости нижней челюсти и в аутотрансплантате с охлаждением (физраствор). Аутотрансплантат фиксировали титановым винтом. При этом красный костный мозг аутотрансплантата контактировал с воспринимающим ложем нижней челюсти. Рану послойно ушивали (Викрил 5,0). По ходу операции осуществляли гемостаз.

Животным внутримышечно вводили антибиотик Байтрил (Эндофлосацин) 5% по 0,1 мл на животное из расчета примерно 10 мг/кг. В дальнейшем антибиотик вводили повторно на 2 сутки после дня операции.

Животных выводили из эксперимента на 21, 60, 120 и 180 сутки после операции по 3 животных на точку наблюдения.

Методика гистологического исследования

Выделяли костные образования из области операции и фиксировали их в 10% нейтральном формалине. Костную ткань декальцинировали в 25% Трилоне Б и заливали в парафин. Серийные срезы окрашивали гематоксилин-эозином и по Ван-Гизон.

Результаты исследования

Как показало проведенное исследование, в сроки 21 сутки опыта ведущим процессом в области транс-

плантации аутокостного материала на челюстную кость с инокуляцией в область операции аутогенной культуры МСК, полученной из жировой ткани, явился процесс активного остеогенеза в зоне трансплантации, причём как в области материнской кости, так и по краям аутотрансплантата, а также костных осколков (рис. 1А на 2-й странице обложки).

Между этими зонами активного остеогенеза располагалась соединительнотканная прослойка, которая как бы разграничивала эти два «нуклеуса» клеточной остеогенетической активности.

В группе сравнения, где отсутствовало поддерживающее остеогенез воздействие МСК остеогенетическая активность либо отсутствовала, либо была чрезвычайно низкой. Помимо этого наблюдались и цитологические признаки низкой компетентности указанных клеток. Они, как правило, были мелкими и иррегулярными по своему расположению у краёв костных трабекул, которые в этой группе наблюдений и сами по себе были крайне скудно и нерегулярно представлены в области контакта аутокостный трансплантат — материнская кость (рис. 1Б на 2-й странице обложки).

Исследование материала 60-е сут. опыта свидетельствовало о том, что инокуляция липогенных МСК значительно повышала интенсивность образования новых костных трабекул и способствовала заполнению пространства между аутокостным трансплантатом и материнской костью новообразованным костным веществом. Вновь образованная кость проявляла тенденцию к компактизации, нередко при сохранении её грубоволокнистого характера. Отмечалось появление участков с более высоким уровнем дифференциации костной ткани, вплоть до образования некоторых количеств остеонных систем, однако, ещё иррегулярных. В одном из наблюдений отмечалось образование плотного соединения между аутотрансплантатом и материнской костью (рис. 2 на 2-й странице обложки).

На значительных пространствах наблюдалось отложение остеоидного вещества, что свидетельствовало о чрезвычайно высокой интенсивности костеобразовательного процесса.

Вновь образованное незрелое костное вещество характеризовалось высокой насыщенностью клеточными элементами, с преобладанием молодых и активно синтезирующих остеобластов.

В группе сравнения костеобразовательный процесс был выражен очень слабо, либо отсутствовал вовсе. Клеточные элементы в группе сравнения характеризовались признаками низкой синтетической активности, они были мелкими, их количество было снижено и располагались эти клетки иррегулярно.

На 120-е сут. опыта анализ гистологических картин показал, что в группе с инокуляцией МСК (основная группа) во всех случаях в пространстве между аутоотрансплантатом и материнской костью формировалась новая костная ткань, которая спаивала аутокостный трансплантат и материнскую кость в единое костное образование. Новообразованная костная ткань, как правило, имела склонность к компактизации. Местами для новообразованной костной субстанции была характерна высокая насыщенность клеточными элементами, что, соответствовало характеристике этих участков как молодого низко дифференцированного костного вещества.

Даже в случае сохранения в области контакта двух костных формаций, разделенных фиброзной прослойкой (1 наблюдение), по их краям отмечалось интенсивное новообразование костных трабекул.

В группе сравнения отмечалась чрезвычайно низкая остеогенная активность, что, в частности, выражалось в малом количестве новых трабекул либо полном их отсутствии между ауто- и материнской костью. Обширные территории этого пространства были заняты грубоволокнистой соединительной тканью (рис. 3 на 2-й странице обложки).

При этом отмечалось, что ткань аутоотрансплантата не оставалась интактной, в ней происходило запустевание значительной части клеточных лакун, что должно расцениваться, как проявление альтерации.

Следует подчеркнуть, что в основной группе опытов наблюдалась определённая завершенность процесса дифференциации новообразованной костной субстанции. В этом состояло одно из важных следствий инокуляции в область операции на ранних этапах опыта мезенхимальных стволовых клеток. Дериваты этих клеток, по-видимому, сохранились на поверхности аутоотрансплантата и проявили себя в отдаленные сроки эксперимента, детерминируя продолжение процесса остеогенеза и вторичную перестройку (ремоделирование) вновь образовавшегося в пространстве между аутокостным трансплантатом и материнской костью костного вещества.

Сопоставление гистологических картин в основной группе и в группе сравнения свидетельствовало о том, что различия между ними касаются не только количества вновь образованных костных структур, но также и качественных характеристик нового костного вещества, которое в основной группе в отдаленные сроки наблюдений местами приобретало пластинчатое строение с развитием остеонных систем.

В группе сравнения наблюдалось очень слабое или практически полное отсутствие проявлений остеогенетических процессов, как в плане новообразования костных структур, так и структурных характеристик остеобластических элементов. Их количество было снижено, они

были уменьшенными в размерах и располагались вдоль костного края, зачастую изъеденного в результате резорбции, с нерегулярными перерывами.

Заключение

Как показало проведенное исследование, в основной группе, животным которой инокулировали в область операции липогенные МСК, начиная с 21 суток, в пространстве между аутоотрансплантатом и материнской костью происходило интенсивное построение новых костных трабекул.

Цитологические характеристики остеобластических элементов, новообразованных костных структур в пространстве между материнской костью и аутоотрансплантатом свидетельствовали о высокой синтетической активности этих клеток.

На 60-е сутки опыта в результате пролиферации остеогенных клеток в основной группе у костных краев наблюдалось образование широкого пласта из указанных клеток, который отграничивался от окружающих тканевых элементов тонкой соединительнотканной пластинкой.

В основной группе опытов, начиная с 60-х суток опыта (1 животное), а в последующем — у подавляющего их числа, в результате активных остеогенетических процессов, в пространстве между аутоотрансплантатом и материнской костью происходило спаивание указанных костных образований в единое целое.

По мере увеличения сроков наблюдения, новообразованное костное вещество в пространстве между аутокостным трансплантатом и материнской костной тканью подвергалось дифференциации. Это выражалось в превращении его матрикса в части случаев из грубоволокнистого в пластинчатый с развитием остеонных систем.

В группе сравнения, животным которой не вводили МСК, в пространстве между аутоотрансплантатом и материнской костью формировались обширные поля фиброзной соединительной ткани, которые прослеживались во все сроки наблюдений.

Данные настоящего исследования демонстрируют высокий уровень стимулирующего действия аутогенных МСК из жировой ткани на процессы остеогенеза, что свидетельствует о целесообразности их применения при дефиците костной ткани в области альвеолярного отростка на этапе подготовки пациентов к дентальной имплантации.

Данные, представленные в настоящем исследовании, в определенной мере согласуются с результатами проведенных ранее работ [1, 2]. В частности, было продемонстрировано, что мезенхимальные стволовые клетки осуществляют важную для поддержания жизнедеятельности организма, в том числе при патогенных воздействиях, защитную/протекторную функцию [10, 11].

Список литературы

1. Кулаков А.А., Григорьян А.С., Киселева Е.В. с соавт. Устранение критических костных дефектов с помощью биоинженерной конструкции на нерезорбируемой полимерной основе с использованием аутогенных мультипотентных стромальных клеток из жировой ткани // Стоматология. — 2010. — №3. — С. 9-12.
2. Сабурова И.Н. Эпителио-мезенхимальная пластичность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в норме и патологии (экспериментальное исследование): Автореф. дисс. д.б.н. — М., 2010.
3. Фриденштейн А.Я., Чайлахян Р.К., Герасимов Проллиферативный и дифференцировочный потенциал скелетогенных колонеобразующих клеток костного мозга // Цитология. — 1986. — Т. 28, №3. — С.341-349.
4. Bianco P., Cao X., Frenette P.S. et al. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine // Nature Medicine. — 2013. — Vol. 19. — P. 35-42.
5. Phinney D.G. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: implications for cell therapy // Journal of Cellular Biochemistry. — 2012. — Vol. 113. — P. 2806-1282.
6. Deng Z.L., Sharff K.A., Tang K.A. et al. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development // Frontiers in Bioscience. — 2008. — Vol. 13, №6. — P. 2001-2021.
7. Dennis J.I., Haynesworth S.E., Young R.G., Caplan A.I. Osteogenesis in marrow derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously; effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenesis expression // Cell. Transplant. — 1992. — Vol. 1. — P. 123-232.
8. Ducy P., Zhang, Geoffroy R.V., Ridall A.L., Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation // Cell. — 1997. — Vol. 89, №5. — P. 747-754.
9. Ohguslu I.I., Goldberg V.M., Caplan A.I. Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells // J. Orthop. Res. — 1989. — 7 (4). — P. 568-578.
10. Pankaj K., Blanpain C., Rossi D.J. DNA damage response in adult stem cells: pathways and consequences // Nature Reviews Molecular Cell Biology. — 2011. — Vol. 12. — P. 198-02.
11. Timmers L., Lim, S.K., Arslan F., Armstrong, J.S., Hofer, I.E., Doevendans, P.A., Piek, J.J. El Oakley, R.M., Choo, A., Lee, C.N., Pasterkamp, de Kleijn G. Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium // Stem Cell Research. — 2008. — Vol. 1. — Issue 2. — P. 129-137.

Поступила 13.11.13

Сведения об авторах:

Орлов Андрей Алексеевич, д.м.н., проф. зав. отделением Трансляционной медицины, Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии РАМН; главный врач частной стоматологической клиники «Академическая стоматология»

Сабурова Ирина Николаевна, д.б.н., зав. лабораторией новых клеточных технологий, Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии РАМН

Сысов Сергей Дмитриевич, зав. отделением
Григорьян А.С.

Е.В. Митичкина¹, С.Г. Морозов², И.А. Захарова², Е.Н. Волкова³, И.В. Елистратова¹

Лейкоцитарная эластаза, альфа 1-протеиназный ингибитор и С-реактивный белок у пациентов с замедленной негативацией серологических реакций после лечения ранних форм сифилиса

¹ Главный военный клинический госпиталь внутренних войск МВД России, 143900, Моск. обл., г. Балашиха, Вишняковское ш., вл. 101

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

³ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1

Исследована активность лейкоцитарной эластазы, альфа 1-протеиназного ингибитора и содержание С-реактивного белка у пациентов с замедленной негативацией серологических реакций (ЗНСР) после полноценного лечения сифилиса. По результатам исследований пациенты с ЗНСР разделились на три подгруппы. В первую подгруппу вошли пациенты, у которых отсутствовали признаки неспецифической реакции иммунной системы, и отсутствие негативации серологических реакций у них, видимо, обусловлено иммунологическими нарушениями. Вторую подгруппу составили пациенты с явными признаками инфекционного процесса в организме, у которых были повышены значения содержания исследуемых медиаторов воспаления. Возможно, что у этого контингента трепонема полностью не элиминирована из организма. В третью подгруппу были отнесены оставшиеся пациенты с сомнительными результатами, где нельзя однозначно сказать о наличии или отсутствии инфекционного процесса и, соответственно, трепонемы. Полученные результаты могут иметь большое значение для определения дальнейшей тактики лечения пациентов с ЗНСР.

Ключевые слова: сифилис, замедленная негативация серологических реакций, лейкоцитарная эластаза, альфа 1-протеиназный ингибитор, С-реактивный белок

E.V. Mitichkina¹, S.G. Morozov², I.A. Zakharova², E.N. Volkova³, I.V. Elistratova¹

Leukocyte elastase, alpha 1-proteinase inhibitor and C-reactive protein in patients with delayed negativation of serological reactions after treatment of early syphilis

¹ Main Military Clinical Hospital of Russian Ministry of Internal Affairs, ow. 101, Vishnyakovskaya highway, 143900, Moscow region, Balashikha, Russia

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

³ Pirogov Russian National Research Medical University, 1, Ostrovityanov str., 117997, Moscow, Russia

It was investigated the activity of leukocyte elastase, alpha 1-proteinase inhibitor and C-reactive protein in patients with delayed negativation of serological reactions after a treatment of syphilis. The patients were divided into three subgroups. The first subgroup consisted of patients who did not have the signs of non-specific immune system response. Second subgroup consisted of patients with clear signs of infection process. The patients this subgroup had elevated values of the contents of inflammatory mediators. The remaining patients with questionable results were attributed in the third subgroup. The obtained results can be of great value to determine further treatment strategy in patients with delayed negativation of serological reactions.

Key words: syphilis, delayed negativation of serological reactions, leukocyte elastase, alpha 1-proteinase inhibitor, C-reactive protein

Замедленная негативация серологических реакций (ЗНСР) через год после полноценного лечения ранних стадий сифилиса — это отсутствие негативации реакции связывания комплемента с трепонемным и кардиолипидным антигенами (РСК), при наличии снижения титра реактивов (не более чем в 4 раза) или снижения степени позитивности РСК [5, 7, 8].

Вопрос о причинах замедления негативации серологических реакций после полноценного лечения сифилиса по сей день остается актуальным в современной венерологии. Известно, что ЗНСР после терапии сифилиса с использованием различных методик по данным разных авторов составляет от 15% до 30% [2, 4, 5, 9].

В настоящее время существует несколько теорий формирования ЗНCR. Ряд исследователей связывают ЗНCR с формированием иммунопатологических нарушений. Рассматриваются различные варианты этих нарушений: от иммунодефицитных состояний по клеточному звену и нарушения функционирования макрофагов до формирования аутоиммунных реакций в организме больных. Согласно одной из гипотез, длительное течение инфекционного процесса создает условия для образования антиидиотипических антител (АИАТ), способных воспроизводить структурные и функциональные свойства номинального антигена, что ведет к длительному поддержанию продукции антител к антигенам бледной трепонемы за счет индуцирующего влияния АИАТ на соответствующие идиотип-позитивные Т- и В-клетки, т.е. развитию относительно замкнутого иммунологического цикла, не реагирующего на проводимое лечение [10, 17].

Согласно другой точке зрения, наиболее вероятной причиной ЗНCR является персистенция бледных трепонем в организме в L-форме, в форме цист или заключенных в полимембранные фагосомы, сосуществующих, таким образом, с организмом хозяина и обеспечивающих в то же время антигенную стимуляцию [3, 4, 11, 14].

Установление причин ЗНCR является достаточно сложной задачей, решение которой необходимо для выбора стратегии дальнейшего лечения пациентов с ЗНCR. Поэтому существует необходимость поиска критериев наличия *T. pallidum* в организме, т.к. остается открытым вопрос, в каких случаях возбудитель присутствует в организме, а в каких — нет.

Одним из подходов для решения данного вопроса является исследование показателей неспецифической защиты организма. Ранее проводились исследования нейтрофильного фагоцитоза, уровня интерлейкина-1, интерлейкина-2, неоптерина и бета-2-микроглобулина у пациентов с ЗНCR [7, 12]. Однако полученные результаты не позволяют однозначно утверждать о сохранении или элиминации *T. pallidum* в организме.

Для изучения активности инфекционного процесса нами были выбраны три фактора неспецифической иммунной защиты: лейкоцитарная эластаза (ЛЭ), α_1 -протеиназный ингибитор (α_1 -ПИ) и С-реактивный белок. Лейкоцитарная эластаза является одним из протеолитических ферментов нейтрофилов. Активность ЛЭ регулируется α_1 -ПИ, который снижает протеолитическую активность ЛЭ и играет важную регуляторную роль в противовоспалительных процессах [6, 17]. С-реактивный белок (СРБ) является одним из центральных участников острой фазы воспаления. СРБ является наиболее ранним и чувствительным лабораторным индикатором активности инфекционного процесса и исследование его содержания широко при-

меняется для мониторинга и контроля эффективности терапии различных инфекций [11, 15, 16].

Цель исследования — определение активности ЛЭ, α_1 -ПИ и содержания СРБ в сыворотке крови у пациентов с ЗНCR для определения вероятности элиминации *T. pallidum* после лечения ранних форм сифилиса.

Методика

Были исследованы сыворотки пациентов с ЗНCR (n = 172) и с негативацией серологических реакций (НСР) (n=118) после проведенного лечения сифилиса в возрасте от 31 до 50 лет, а также здоровых доноров возрастом от 28 до 46 лет (n = 120). Большинство пациентов с ЗНCR и НСР получали специфическую терапию по поводу скрытого раннего сифилиса (85,8%). У 12,7% пациентов был вторичный сифилис кожи и слизистых, у 1,5% — первичный сифилис половых органов. Специфическое лечение больные со скрытыми формами сифилиса получали дюрантными препаратами пенициллина (ретарпен или экстенциллин), водорастворимым пенициллином (бензилпенициллина натриевая соль) и препаратами средней дюрантности (цефтриаксон). При вторичном сифилисе применялись дюрантные препараты и натриевая соль пенициллина. При первичном сифилисе пациенты получали бензатина бензилпенициллин.

Клинико-серологический контроль (КСК) после окончания специфического лечения осуществлялся 1 раз в 3 месяца в течение первого года наблюдения и 1 раз в 6 мес. в последующие годы с постановкой нетрепонемных тестов (реакция связывания компонента с трепонемным и кардиолипидным антигенами и реакции микропреципитации), 1 раз в год — с постановкой соответствующего трепонемного теста, который использовался при диагностике заболевания (реакция иммобилизации бледной трепонемы, реакция иммунофлуоресценции, реакция пассивной гемагглютинации, иммуноферментный анализ).

Больные ранними формами сифилиса с НСР находились на КСК до негативации серологических нетрепонемных тестов, а затем еще в течение 6-12 мес., в течение которых было проведено 2 обследования. Длительность КСК определялась индивидуально в зависимости от результатов лечения.

В группу пациентов с ЗНCR не были включены лица с сопутствующей инфекционной патологией (вирусные гепатиты В, С и др.), аутоиммунными заболеваниями и какой-либо хронической патологией (гастрит, дуоденит, язвенная болезнь желудка и 12-перстной кишки, хронический пиелонефрит и др.).

Для определения активности ЛЭ и α_1 -ПИ использовали наборы реагентов «ЭЛАСТАЗА» и «АЛЬФА-1-ПИ» (ООО «Биофарм-тест»).

Для определения активности ЛЭ, находящейся в сыворотке крови в комплексе с $\alpha 1$ -ПИ применяли спектрофотометрический метод с использованием в качестве хромогенного субстрата N-терт-бутоксикарбонил-аланин- ρ -нитрофенилового эфира (ВОС-Ala-ONp) в присутствии ацетонитрила [6, 17]. В присутствии органического растворителя и при определенном составе буферного раствора происходит разрушение комплекса, приводящее к оттеснению ингибитора и проникновению ВОС-Ala-ONp к активному центру фермента.

Спектрофотометрический метод определения активности $\alpha 1$ -ПИ в сыворотке крови основан на взаимодействии этого ингибитора с трипсином при использовании в качестве субстрата N- α -бензоил-L-аргинин-этилового эфира (БАЭЭ): $\alpha 1$ -ПИ сыворотки крови образует с трипсином комплекс, не расщепляющий БАЭЭ. Поэтому активность $\alpha 1$ -ПИ определяется по степени торможения расщепления трипсином низкомолекулярного субстрата.

Определение концентрации СРБ в образцах сыворотки крови проводили с использованием коммерческой тест-системы для количественного определения СРБ методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) (Имтек, Москва, Россия). Опре-

деление СРБ проводилось в системе твердофазного сэндвич-ИФА. Тест-система укомплектована моноспецифическими кроличьими антителами к СРБ человека, часть которых иммобилизована на внутренней поверхности 96-луночных полистирольных планшетов для ИФА, а другая часть антител использовалась для приготовления конъюгата с пероксидазой хрена. В результате последовательного внесения в лунки планшета исследуемого образца сыворотки и пероксидазного конъюгата антител к СРБ образуются иммунные комплексы. После внесения субстратного буферного раствора регистрируется оптическая плотность, отражающая ферментативную активность связанной пероксидазы. Величина оптической плотности раствора пропорциональна концентрации СРБ в пробе. Для построения калибровочной кривой использовался очищенный СРБ человека.

Статистический анализ полученных результатов проводили в программе «Statistica 6.0». Использовали непараметрические методы математической статистики. Для сравнения результатов в двух независимых выборках применяли U критерий Манна—Уитни и критерий Колмогорова—Смирнова, для сравнения результатов в двух зависимых выборках или двух зависимых переменных — непараметрический критерий Вилкоксона. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Таблица 1

Активность лейкоцитарной эластазы у пациентов с замедлением негативации серологических реакций, негативацией серореакций, и у здоровых доноров

Исследуемая группа	Норма (105–200 нмоль/мин × мл)	Слабо повышена (201–250 нмоль/мин × мл)	Умеренно повышена (251–300 нмоль/мин × мл)	Сильно повышена (более 300 нмоль/мин × мл)
Здоровые доноры (n = 120)	92,5% (n = 111)	7,5% (n = 9)	0,0% (n = 0)	0,0% (n = 0)
ЗНСР (n = 172)	31,4% (n = 54)	25,6% (n = 44)	28,5% (n = 49)	14,5% (n = 25)
НСР (n = 118)	90,7% (n = 107)	9,3% (n = 11)	0,0% (n = 0)	0,0% (n = 0)

Таблица 2

Активность $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора у пациентов с замедлением негативации серологических реакций, негативацией серореакций, и у здоровых доноров

Исследуемая группа	Норма 28–32 ИЕ/мл	Выше 32 ИЕ/мл	Ниже 28 ИЕ/мл
Здоровые доноры (n = 120)	95,8% (n = 115)	1,7% (n = 2)	2,5% (n = 3)
ЗНСР (n = 172)	33,1% (n = 57)	18,6% (n = 32)	48,3% (n = 83)
НСР (n = 118)	86,4% (n = 102)	10,2% (n = 12)	3,4% (n = 4)

Таблица 3

Содержание С-реактивного белка в сыворотке крови пациентов с замедлением негативации серологических реакций, негативацией серореакций, и у здоровых доноров

Исследуемая группа	Содержание С-реактивного белка, мг/л				
	Менее 5 (норма)	5–12	12–25	25–50	Более 50
Здоровые доноры (n = 120)	96,7% (n = 116)	3,3% (n = 4)	0,0% (n = 0)	0,0% (n = 0)	0,0% (n = 0)
ЗНСР (n = 172)	37,2% (n = 64)	20,3% (n = 35)	12,8% (n = 22)	18,6% (n = 32)	11,0% (n = 19)
НСР (n = 118)	86,4% (n = 102)	9,3% (n = 11)	4,2% (n = 5)	0,0% (n = 0)	0,0% (n = 0)

Результаты и обсуждение

Проведено изучение активности ЛЭ, α 1-ПИ и концентрации СРБ в сыворотках крови пациентов с ЗНСР, НСР, а также здоровых доноров. Полученные результаты представлены в табл. 1, 2 и 3.

Наиболее выраженные изменения изучаемых показателей наблюдались в группе пациентов с ЗНСР. В группе пациентов с НСР незначительное повышение содержания СРБ, активности ЛЭ и α 1-ПИ не более чем у 15% обследуемых можно связать с какими-либо инфекционными или деструктивными процессами в организме, не связанными с возбудителем сифилиса. Этим же, вероятно, обусловлены и незначительные отклонения от нормы исследуемых показателей у отдельных здоровых доноров. Кроме того, незначительное повышение СРБ не всегда является отражением инфекционного процесса. Оно может наблюдаться при диабете, уремии, гипертонии, при повышенной физической нагрузке, при низкой физической активности, нарушениях сна, хронической усталости [1].

Проведена комплексная оценка полученных результатов по измерению активности ЛЭ и α 1-ПИ и концентрации СРБ в сыворотках обследуемых пациентов с ЗНСР. Оказалось, что изменения активности ЛЭ, α 1-ПИ и концентрации СРБ не всегда четко коррелировали между собой.

У многих пациентов с ЗНСР (43%, $n = 74$) наблюдалось увеличение активности ЛЭ на фоне сниженной активности α 1-ПИ и повышения концентрации СРБ. Снижение активности α 1-ПИ, по-видимому, указывает на истощение антипротеиназной защиты организма вследствие длительного повышения активности ЛЭ, что является, в целом, неблагоприятным прогностическим фактором в плане дальнейшего развития деструктивных процессов [6, 17]. Такое сочетание исследуемых показателей косвенно свидетельствует о наличии инфекционного процесса в организме этих пациентов.

Слабо повышенная активность ЛЭ при повышенной активности α 1-ПИ и нормальных показателях концентрации СРБ наблюдалась у 4,7% пациентов ($n = 8$). У нескольких обследуемых с ЗНСР (1,7%, $n = 3$) обнаружилась очень высокая активность ЛЭ при нормальных показателях α 1-ПИ и СРБ, а ещё у нескольких пациентов (2,9%, $n = 5$) слабое повышение активности ЛЭ и концентрации СРБ сочеталось с нормальными значениями активности α 1-ПИ.

Среди пациентов с пониженной активностью α 1-ПИ у одной части активность ЛЭ была в пределах нормы, но был незначительно повышен СРБ, у другой части наоборот — нормальные уровни СРБ сочетались со слабо повышенной активностью ЛЭ.

Следует особо отметить, что 28,5% обследуемых пациентов с ЗНСР имели нормальные значения всех трех исследуемых показателей, что косвенно свидетельствует об элиминации *T. pallidum* в результате лечения сифилиса. Причиной ЗНСР в данном случае являются, скорее всего, иммунные нарушения, не связанные с присутствием *T. pallidum* в организме.

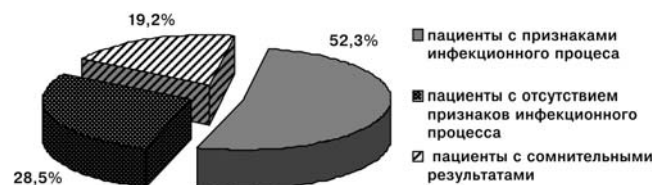
Проанализировав комплексно полученные данные, мы пришли к выводу, что всех обследуемых пациентов с ЗНСР можно разделить на три подгруппы в соответствии с показателями неспецифического иммунитета (рисунок).

В первую подгруппу вошли пациенты, у которых отсутствовали признаки неспецифической реакции иммунной системы (28,5%). Это пациенты с нормальными значениями активности ЛЭ, α 1-ПИ и концентрации СРБ. По-видимому, как уже было сказано, у этих пациентов трепонема в организме отсутствует, а отсутствие негативации серологических реакций обусловлено аутоиммунными нарушениями.

Вторую подгруппу составили пациенты с сильно отличающимися от нормы всеми исследуемыми показателями неспецифической защиты (52,3%), что является признаком инфекционного процесса в организме. Есть все основания полагать, что у этого контингента трепонема полностью не элиминирована из организма.

В третью подгруппу были отнесены оставшиеся пациенты с сомнительными результатами, где нельзя однозначно сказать о наличии или отсутствии инфекционного процесса и, соответственно, сделать вывод об элиминации трепонемы из организма.

Есть основания полагать, что полученные результаты могут иметь большое значение для определения дальнейшей тактики лечения пациентов с ЗНСР. В настоящее время не существует единой точки зрения на ведение таких пациентов. Исследователи, полагаящие, что в основе ЗНСР лежит персистенция *T. pallidum* в организме, считают необходимым дальнейшее продолжение антибиотикотерапии [2, 4, 10]. Те, кто связывает ЗНСР с развитием аутоиммунных нарушений, призывают игнорировать подобные диагностические тесты [7].



Распределение пациентов с замедлением негативации серологических реакций по признаку наличия инфекционного процесса.

Наиболее рациональным, вероятно, является дифференцированный подход к ведению таких пациентов. Тем из них, у кого исследуемые в работе показатели свидетельствуют об активном инфекционном процессе, по-видимому, показана дальнейшая антибиотикотерапия. Пациентам, у кого комплекс показателей неспецифического иммунитета в пределах нормы, вероятно, следует рекомендовать дальнейшее наблюдение без применения повторных курсов антибиотикотерапии. Однако данный подход требует проведения дальнейших углубленных исследований.

Список литературы

1. **Вельков В.В.** С-реактивный белок «золотой маркер», многозначительный и незаменимый. — Пущино, 2005. — 10 с.
2. **Данилов С.И., Назаров П.Г.** Новая концепция формирования серорезистентности после лечения сифилиса // Инфекции, передаваемые половым путем. — 2000. — №2. — С. 16-19.
3. **Дмитриев А.Г., Афонин А.В.** О возможной причине возникновения серорезистентности при сифилитической инфекции // Вестник дерматологии и венерологии. — 2003. — №2. — С. 47-48.
4. **Дмитриев Г.А., Фриго Н.В.** Сифилис. Дифференциальный клинико-лабораторный диагноз. — М.: Медицинская книга, 2004. — 364 с.
5. **Довжанский С.И.** Клиническая оценка серорезистентности при сифилисе // Русский медицинский журнал. — 1998. — Т. 6, №15. — С. 977-980.
6. **Доценко В.Л., Нешкова Е.А., Яровая Г.А.** Выявление лейкоцитарной эластазы из комплекса с плазменным ингибитором по ее энзиматической активности с синтетическим субстратом // Вопр. мед. химии. — М. — 1994. — Т. 40, №3. — С. 20-25.
7. **Ломоносов К.М.** Иммунорегуляторные нарушения как причина серорезистентности и замедленной негативации серологических реакций при сифилисе (клинико-иммунологические аспекты): Дисс. на соискание ученой степени д.м.н. — М., 2000. — С. 18-20.
8. **Мыскин В.С., Лосева О.К., Катунин Г.Л.** «Серорезистентность» при сифилисе в практике дерматовенеролога // Инфекции, передаваемые половым путем. — 2003. — №2. — С. 24-26.
9. **Мыскин В.С., Магарышкина О.В.** О контингенте больных сифилисом с развившейся серорезистентностью // Вестник последипломного образования. — 2001. — №2. — С. 43-45.
10. **Назаров П.Г., Старченко М.Е., Касаткин Е.В., Данилов С.И.** Новая концепция формирования серорезистентности при сифилисе // Вестник дерматологии и венерологии. — 1996. — №6. — С. 17-19.
11. **Нестеренко В.Г., Аковбян В.А., Петренко Л.А.** и др. Серорезистентность после лечения сифилиса: дурнанные пенициллины и новый серологический диагностический комплекс // Российский журнал кожных и венерических болезней. — 2005. — №4. — С. 12-16.
12. **Соколовский Е.В.** Серологическая резистентность после лечения сифилиса. Причины и факторы развития, профилактика и лечение: Автореф. дисс. на соискание ученой степени д.м.н. — СПб., 1995. — С. 15-16.
13. **Lafond R.E., Lukehart S.A.** Biological basis for syphilis // Clin. Microbiol. Rev. — 2006. — Vol. 19, №1. — P. 29-49.
14. **Li J., Wang L.N., Zuo Y.G.** et al. Clinical analysis and study of immunological function in syphilis patients with seroresistance // Zhonghua Yi Xue Za Zhi. — 2009. — Vol. 89, №12. — P. 813-816.
15. **Pepys M.B., Hirschfield G.M.** C-reactive protein: a critical update // J. Clin. Invest. — 2003. — Vol. 111, №12. — P. 1805-1812.
16. **Szalai A.J.** The biological functions of C-reactive protein // Vasc. Pharmacol. — 2002. — Vol. 39, №3. — P. 105-107.
17. **Visser L., Blout E.** The use of p-nitrophenyl N-tert-butylxycarbonyl-L-alaninate as substrate for elastase // Biochim. Biophys. Acta. — 1972. — Vol. 268, №1. — P. 257-260.

Поступила 01.12.13

Сведения об авторах:

Митичкина Елена Валентиновна — врач-дерматовенеролог, Главный военный клинический госпиталь внутренних войск МВД России

Морозов Сергей Георгиевич — д-р мед. наук, проф., чл.-корр. РАМН, зав. лаб. нейроиммунопатологии ФГБУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН (e-mail: biopharm@list.ru)

Захарова Ирина Александровна — канд. биол. наук, старш. науч. сотр. лаб. нейроиммунопатологии ФГБУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН

Волкова Е.Н. — профессор кафедры дерматовенерологии лечебного факультета, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»

Елистратова И.В. — врач-дерматовенеролог, Главный военный клинический госпиталь внутренних войск МВД России

С.П. Сергеева¹, П.Ф. Литвицкий¹, И.Д. Бреславич², М.М. Гульяев³

Изменение соотношения уровней растворимых TNF- α и TNF-R1 в крови как одно из ключевых звеньев патогенеза, диагностический и прогностический показатель при ишемическом инсульте

¹ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава РФ, 119992, Москва, ул. Трубецкая д.8, стр.2

² Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские Горы, 1

³ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный медицинский стоматологический университет им. А.И. Евдокимова

Целью настоящего исследования было изучение динамики содержания sTNF- α , sTNF-R1 в крови пациентов, перенесших ИИ, корреляция их уровней с тяжестью неврологических проявлений. В исследовании приняли участие 60 пациентов, перенесших ИИ, 25 чел. составили группу контроля. Концентрацию sTNF- α , sTNF-R1 определяли иммуноферментным методом. Сделан вывод о том, что на 1 сутки развития ИИ взаимодействие sTNF- α и tmTNF-R1 потенцирует повреждение ткани головного мозга, запуская воспаление и апоптоз, на 7 и 21 сутки ИИ sTNF- α начинает оказывать нейропротекторный эффект. Взаимодействие sTNF- α с растворимой формой sTNF-R1 препятствует нарастанию повреждения. Сделан вывод о важном прогностическом значении динамики соотношения sTNF- α /sTNF-R1 при ИИ.

Ключевые слова: патогенез ишемического инсульта, прогностический маркер, sTNF- α , sTNF-R1

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

The changes of plasma levels of soluble TNF- α and TNF-R1 ratio is a prognostic marker and key element of the stroke pathogenesis

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, B.Pirogovskaya str., Moscow, 119991

The goal of the present study was to investigate the plasma levels of sTNF- α , sTNF-R1 in acute stroke patients, to study the relation between ones, the neurological stroke severity and functional disability. The investigations comprised 60 ischemic stroke patients, 25 patients form control group. Plasma levels of sTNF- α , sTNF-R1 were detected by means of ELISA. The conclusion of interaction of sTNF- α and tmTNF-R1 increases inflammatory and apoptotic brain tissue damage on the first day of stroke is drawn. On the 7-th and 21-st days of stroke sTNF- α realize a neuroprotective effect. The interaction sTNF- α and sTNF-R1 blockade of damage expansion. As the result, prognostic significance of sTNF- α /sTNF-R1 is showed.

Key words: stroke pathogenesis, prognostic marker, sTNF- α , sTNF-R1

Иммунопатологические процессы играют существенную роль в патогенезе ишемического инсульта. Образующиеся при этом цитокины (главным образом, обладающие провоспалительным эффектом) продуцируются в зоне ишемии головного мозга активированными лейкоцитами, глиальными клетками, потенцируют воспаление, увеличивая лейкоцитарную инфильтрацию зоны ишемии мозга и степень повреждения нейронов [6].

TNF- α , обладающий провоспалительным действием, может служить сигналом к гибели клеток пу-

тем инициации апоптоза или некроза. TNF- α способен также вызывать экспрессию генов, способствующих ангиогенезу в зоне ишемии [1, 3]. TNF- α выступает и в качестве триггера процессов адаптации ткани мозга к ишемии. Индукция синтеза TNF- α при дозированных физических упражнениях, равно как и образование ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2), играют существенную роль в восстановлении функционирования гематоэнцефалического барьера [2].

Выделяют две формы TNF- α : мембраносвязанную (tmTNF- α) и образующуюся при действии матриксной металлопротеиназы TNF-превращающего фермента (TACE) растворимую форму (sTNF- α). Обе эти формы экспрессируются в центральной нервной системе клетками микроглии, астроцитами, отдельными популяциями нейронов. Они взаимодействуют со специфичными рецепторами TNF-R1 и TNF-R2 на поверхности клеток, оказывая вышеупомянутые эффекты. TNF-R1 экспрессируется всеми типами клеток и может быть активирован как мембраносвязанной, так и растворимой формой TNF- α . В отличие от этого, TNF-R2 экспрессируется клетками иммунной системы, микроглии, эндотелиоцитами и взаимодействует только с tmTNF- α , потенцируя действие R1. Доказано, что экспрессия TNF-R1 коррелирует с усилением гибели нейронов, а TNF-R2 участвует в реализации механизмов нейропротекции. Существуют также растворимые формы TNF-R1 и TNF-R2 (sTNF-R1 и sTNF-R2 соответственно), которые образуются путем альтернативного сплайсинга, в результате действия матриксной металлопротеиназы. Эти формы sTNF-R способны связывать свой лиганд TNF- α . При этом наибольшей афинностью к TNF- α обладает sTNF-R1 [4, 8].

Работы отдельных исследовательских групп показали наличие положительной связи между степенью повреждения головного мозга в результате его локальной ишемии, выраженностью неврологических проявлений и содержанием sTNF- α в крови, а также растворимых рецепторов к TNF- α [5, 7]. Однако не показаны корреляционные связи, прогностическое значение данных параметров на достаточной выборке.

Цель исследования — изучение динамики содержания sTNF- α , sTNF-R1 в крови пациентов, перенесших ИИ, корреляция их уровней с тяжестью неврологических проявлений и их динамикой.

Методика

Проведено проспективное одноцентровое контрольно-групповое исследование. Оно не изменяло плана диагностических и лечебных мероприятий: все пациенты получали объем медицинской помощи в соответствии со стандартом медицинской помощи больным с инсультом (при оказании специализированной помощи). Исследование соответствовало требованиям Хельсинкской Декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000). Критериями включения были: впервые развившийся ИИ, установленный клинически и при помощи методов нейровизуализации (КТ, МРТ); критериями исключения: наличие черепно-мозговых травм, транзиторных ишемических атак, рассеянного склероза, онкологических и аутоиммунных заболеваний в анамнезе, аллергических реакций на момент исследования.

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

Для объективизации оценки тяжести состояния, выраженности очагового неврологического дефицита и динамики клинических показателей использовалась балльная шкала оценки тяжести неврологического дефицита после инсульта Национального института здоровья (NIHSS). Концентрацию TNF- α , TNF-R1 определяли на 1, 7 и 21 сутки после ИИ методом иммуно-ферментного анализа (ИФА) с использованием стандартных тест-систем (Bender Medsystems, Vienna, Austria).

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

Таблица 1

Характеристика обследованных пациентов и группы контроля

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

В зависимости от исхода острого периода ИИ были сформированы две подгруппы пациентов: подгруппа с благоприятным (балл по шкале NIHSS на 21 сутки менее 5) и с неблагоприятным исходом (балл по шкале NIHSS на 21 сутки более 5).

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

Результаты и обсуждение

У пациентов, перенесших ИИ, отмечено статистически значимое по сравнению с группой контроля увеличение концентрации sTNF- α во все сроки исследования (рис. 1), однако наиболее выражено оно было на 1 сутки, что совпадает с результатами наших предыдущих исследований и данными литературы [3, 5, 6].

В группе пациентов с благоприятным исходом содержание sTNF- α на 1 сутки ИИ была статистически значимо ниже, чем у пациентов с неблагоприятным исходом ($p < 0,05$). Указанный параметр не имеет прогностического значения, так как не получено статистически значимой зависимости между концентрацией sTNF- α на 1 сутки и баллом по шкале NIH на 21 сутки исследования ($r = 0,323$, $p = 0,07$). При корреляционном анализе с учетом подгрупп пациентов с благоприятным и неблагоприятным исходом ИИ получены противоположно направленные результаты: в группе пациентов с благоприятным исходом зависимость sTNF- α на 1 сутки от NIH на 21 была отрицательной ($r = -0,27$), а в группе с неблагоприятным исходом положительной ($r = 0,29$) при $p > 0,05$. Динамика содержания sTNF- α в крови не отражала тяжести состояния пациента ($r = 0,1$, $p > 0,05$).

Концентрация sTNF-R1 у пациентов обеих подгрупп не отличалась значимо от таковой в группе контроля. Прогностического значения концентрация sTNF-R1 не имела ($r = -0,23$, $p > 0,05$). При корреляционном анализе с учетом подгрупп пациентов с благоприятным и неблагоприятным исходом (так же как и при анализе концентрации sTNF- α) получены противоположно направленные результаты: в группе пациентов с благоприятным исходом зависимость sTNF-R1 на 1 сутки от NIH на 21 была положительной ($r = 0,5$, $p > 0,05$), а в группе с неблагоприятным исходом — отрицательной ($r = -0,45$, $p < 0,05$). Динамика концентрации sTNF- α не отражала динамики тяжести состояния пациента ($r = -0,03$, $p > 0,05$).

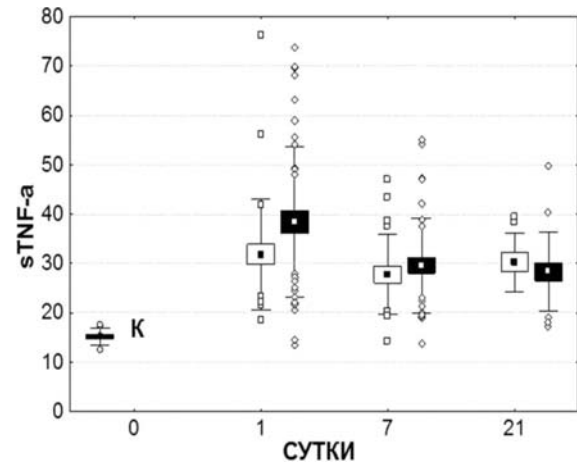


Рис. 1. Концентрация sTNF- α в крови на 1, 7, 21 сутки после ИИ у пациентов в группе с благоприятным исходом (белый), в группе с неблагоприятным исходом (черный) и в группе контроля (К) (пг/мл).

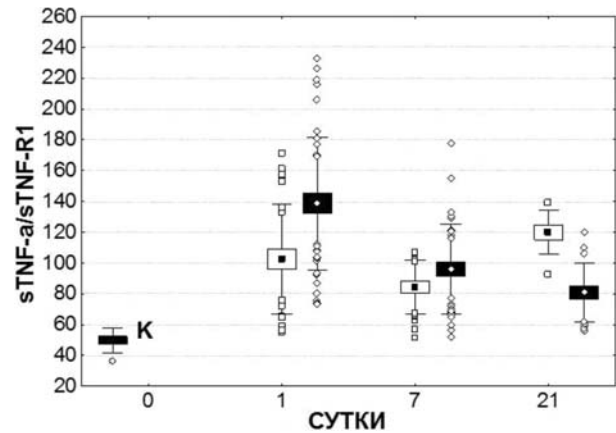


Рис. 2. Соотношение концентрации sTNF- α и sTNF-R1 в крови на 1, 7, 21 сутки после ИИ у пациентов в группе с благоприятным исходом (белый), в группе с неблагоприятным исходом (черный) и в группе контроля (К).

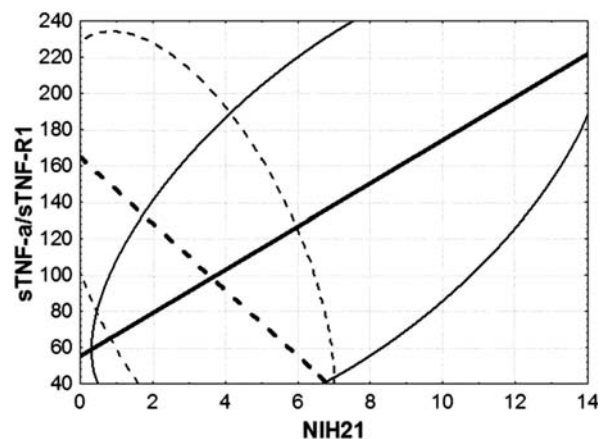


Рис. 3. Зависимость между соотношением концентрации sTNF- α и sTNF-R1 в крови на 1 сутки после ИИ и баллом по шкале NIH на 21 сутки после ИИ у пациентов в группе с благоприятным исходом (пунктир), в группе с неблагоприятным исходом (сплошная).

Данные к рисункам

ХОРОШИЙ		
ПАРАМЕТР	sTNF- α , пг/мл	sTNF- α /sTNF-R1, 10 ⁻³
КОНТРОЛЬ	15,16 \pm 0,51	49,82 \pm 2,46
1	31,85 \pm 2,06	102,35 \pm 6,49
7	27,78 \pm 1,76	84,25 \pm 3,84
21	30,28 \pm 1,98	119,74 \pm 4,77

ПЛОХОЙ		
ПАРАМЕТР	sTNF- α , пг/мл	sTNF- α /sTNF-R1, 10 ⁻³
КОНТРОЛЬ	15,16 \pm 0,51	49,82 \pm 2,46
1	38,36 \pm 2,3	138,56 \pm 6,47
7	29,58 \pm 1,56	96,07 \pm 4,71
21	28,34 \pm 1,85	80,75 \pm 4,38

	УРАВНЕНИЕ РЕГРЕССИИ	R	P
ХОРОШИЙ	$y = 164,82 - 18,25 \cdot x$	-0,57	0,068
ПЛОХОЙ	$y = 55,44 - 11,88 \cdot x$	0,66	0,001

Соотношение sTNF- α /sTNF-R1 во все сроки исследования в обеих подгруппах было статистически значимо выше, чем в группе контроля (рис. 2).

Однако если у пациентов с неблагоприятным исходом это соотношение статистически значимо снижалось с 1 по 21 сутки на 40% ($p < 0,05$), то в другой подгруппе статистически значимой динамики не отмечено ($p > 0,05$). Результаты корреляционного анализа соотношения sTNF- α /sTNF-R1 показали его важное прогностическое значение, так как статистически значимо прямо коррелировали с баллом НИН на 21 сутки исследования ($r = 0,47$, $p < 0,01$), а средние значения соотношения в подгруппах на 1 сутки различались на 35% ($p = 0,06$). При корреляционном анализе с учетом подгрупп пациентов с благоприятным и неблагоприятным исходом получены альтернативные результаты: в группе пациентов с благоприятным исходом зависимость соотношения sTNF- α /sTNF-R1 на 1 сутки от НИН на 21 была обратной ($r = -0,56$, $p > 0,05$), а в группе с неблагоприятным исходом прямая ($r = 0,66$, $p < 0,01$) (рис. 3).

Анализ результатов исследования позволяет сделать вывод о том, что на 1 сутки развития ИИ взаимодействие sTNF- α и tmTNF-R1 потенцирует повреждение ткани головного мозга, запуская нарастающую цепную реакцию таких процессов, как воспаление и апоптоз. Напротив, взаимодействие sTNF- α с растворимой формой sTNF-R1 препятствует нарастанию повреждения.

Приведенные выше факты свидетельствуют о важном прогностическом значении динамики соотношения sTNF- α /sTNF-R1 при ИИ. Они объясняют также различия в изменении этого показателя в подгруппах с благоприятным и неблагоприятным исходами ИИ, а также прямую зависимость выраженности неврологического дефицита от концентрации

sTNF- α в крови пациентов с ИИ на данном сроке исследования.

Есть основания считать, что при благоприятном исходе ИИ на его 7 и 21 сутки sTNF- α начинает оказывать нейропротекторный эффект, играя ключевую роль в восстановлении функционирования гематоэнцефалического барьера: в крови пациентов с благоприятным исходом на 21 сутки наблюдается уменьшение концентрации sTNF-R1, а величина соотношения sTNF- α /sTNF-R1 достоверно не изменяется с течением времени. В отличие от этого, при неблагоприятном исходе к 21 суткам уровень этого показателя достоверно понижается.

Список литературы

1. *Goukassian D.A., Qin G., Dolan C.* et al. Tumor necrosis factor-alpha receptor p75 is required in ischemia-induced neovascularization // *Circulation*. — 2007. — Vol. 115. — P. 752-762.
2. *Guo M., Lin V., Davis W.* Preischemic induction of TNF- α by physical exercise reduces blood-brain barrier dysfunction in stroke // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. — 2008. — Vol. 28. — P. 1422-1430.
3. *Huang J, Upadhyay U.M., Tamargo R.J.* Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia // *Surg. Neurol*. — 2006. — Vol. 66. — P. 232-245.
4. *Idriss H.T., Naismith J.N.* TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationships // *Microscopy Research and Technique*. — 2000. — Vol. 50. — P. 184-195.
5. *Lambertsen K.L., Biber K., Finsen B.* Inflammatory cytokines in experimental and human stroke // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. — 2012. — Vol. 32. — P. 1677-1698.
6. *Ormstad H., Dalsbotten H.C., Lund-Sorensen N.* Serum levels of cytokines and C-reactive protein in acute ischemic stroke patients, and their relationship to stroke laterali-

zation, type, and infarct volume // J. Neurol. — 2011. — Vol. 258. — P. 677-685.

7. *Pana W., Dinga Y., Yua Y.* et al. Stroke upregulates TNF transport across the blood-brain barrier // Experimental Neurology. — 2006. — Vol. 198, №1. — P. 222-233.

8. *Wajant H., Pfizenmaier K., Scheurich P.* Tumor necrosis factor signaling // Cell Death Differ. — 2003. — Vol. 10. — P. 45-65.

Поступила 22.06.13

Сведения об авторах:

Сергеева С.П. — канд. мед. наук, доцент кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ

Литвицкий П.Ф. — д-р мед. наук, зав. кафедрой патофизиологии ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ

Бреславич И.Д. — соискатель кафедры аэромеханики и газовой динамики МГУ им. М.В. Ломоносова

Гультяев М.М. — канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории патогенеза и методов лечения инфекционных заболеваний ГБОУ ВПО МГМСУ им. А.И. Евдокимова

Влияние антител к глутамату на содержание моноаминов в структурах мозга крыс после фотохимического ишемического повреждения префронтальной коры

Ф.М. Шакова¹, П.М. Клодт², В.С. Кудрин², Т.В. Давыдова¹, Г.А. Романова¹

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

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

На модели двустороннего фотохимического ишемического повреждения префронтальной коры головного мозга крыс показано, что антитела к глутамату при их однократном интраназальном введении через 1 час после фототромбоза коры способствуют снижению эксайтотоксичности в исследованных структурах мозга, что приводит к изменению уровня дофамина и серотонина, а также их метаболитов, в префронтальной коре и гиппокампе.

Ключевые слова: ишемия, антитела к глутамату, моноамины, дофамин, серотонин, их метаболиты, фототромбоз, префронтальная кора, гиппокамп

F.M. Shakova, P.M. Klodt, V.M. Kudrin, T.V. Davydova, G.A. Romanova

Federal State Budgetary Institution «Institution of General Pathology and pathophysiology» of the Russian Academy of Medical Science, Russian Federation, 125315, Moscow, Baltiiskaya, 8

Federal State Budgetary Institution «Institution of Pharmacology» of the Russian Academy of Medical Science, Russian Federation, 125315, Moscow, Baltiiskaya, 8

The influence of glutamate antibodies on the level of neurotransmitter monoamines in brain structures of rats with ischemic damage of prefrontal cortex

Experiments on the model of bilateral photothrombosis in prefrontal cortex showed that antibodies to glutamate one-time administered intranasally 1h after ischemic damage to the brain cortex lead to decrease of neurodegenerative influence of excitatory neurotransmitter after photothrombosis. It was showed the change of the level of dopamine, serotonin and their metabolites in hippocampus and prefrontal cortex.

Key words: rats, antibodies to glutamate, monoamines, serotonin, dopamine, prefrontal cortex of brain, hippocampus

В последние годы значительно увеличился фронт исследований, направленных на понимание патогенеза ишемического повреждения мозга и поиск фармакологических средств, вызывающих усиление регенеративных процессов при данной патологии [7, 11]. Эти исследования имеют не только теоретическое патофизиологическое значение, но и необходимы для неврологической практики, так как известно, что тромбоз сосудов головного мозга является причиной около 75% инсультов у людей и почти всегда приводит к когнитивным расстройствам: нарушению памяти, обучаемости и анализа ситуации, значительно снижая качество жизни [5].

Известно, что передние префронтальные отделы неокортекса у крыс наряду с гиппокампом играют ключевую роль в процессах обучения и памяти [6, 8, 9, 10]. В основе интегративной деятельности мозга

лежат события, обеспечиваемые классическими нейромедиаторами, которые оказывают действие на нейрохимические реакции в нейронах, способствуя консолидации и воспроизведению памятного следа [1]. Одним из главных механизмов при ишемических и травматических повреждениях мозга является нарушение глутаматергической нейротрансмиссии в головном мозге [2, 3]. Глутамат является основным возбуждающим нейротрансмиттером в ЦНС, участвующим во многих процессах мозговой деятельности, включая когнитивные функции [1, 9]. Эксайтотоксичность один из основных патологических механизмов, приводящих к повреждению и гибели нейронов при нейродегенеративных заболеваниях и ишемии головного мозга. Все существующие методы нейропротекции остаются недостаточно эффективными [16] и нуждаются в дальнейшей разработке.

В связи с этим целью настоящей работы было изучение влияния антител к глутамату (АТ-ГЛ) на содержание моноаминов и их метаболитов в префронтальной коре и гиппокампе в 1-е и на 8-е сутки после фототромбоза префронтальной области коры мозга крыс.

Методика

Работа выполнена на 48 беспородных крыс-самцах массой 200-220 г, выращенных в виварии НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН. Животные содержались в виварии при свободном доступе к пище, воде и 12-часовом световом режиме. При работе с крысами соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований.

Экспериментальные животные были разделены на две серии: I — первые и II — восьмые сутки после фотохимического ишемического повреждения префронтальной коры. Каждая серия была разделена на 4 группы:

- 1-я группа (n = 6) — ложнооперированные;
- 2-я группа (n = 6) — крысы с двусторонним фототромбозом префронтальной коры головного мозга, которым однократно через 1 час после операции вводили интраназально по 7 мкл NaCl 0,9%;
- 3-я группа (n = 6) — крысы, которым после ишемического повреждения по той же схеме вводили интраназально водный раствор АТ-ГЛ в дозе 250 мкг/кг;
- 4-я группа (n = 6) — ишемизированные крысы, которым в качестве контроля вводили водный раствор кроличьего γ -глобулина от интактных животных по той же схеме, в дозе 250 мкг/кг.

Двустороннее фокальное ишемическое повреждение префронтальной коры головного мозга крыс — поля Fr1 и Fr2 по стереотаксическому атласу [12], создавали методом фотохимически индуцируемого тромбоза [19]. Операцию проводили под наркозом, вызываемым внутривенным введением хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг. Перед операцией наркотизированным животным вводили внутривенно в v. jugularis 3% раствор фоточувствительного красителя бенгальского розового (Rose Bengal from Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA) в дозе 40 мг/кг. Крысу фиксировали в стереотаксисе, делали продольный разрез кожи и отделяли надкостницу. Для облучения использовали специальную установку, состоящую из источника света — галогеновой лампы ($\lambda = 560$ нм) мощностью 250 W (25V), охлаждаемой вмонтированным в установку вентилятором, и световода с диаметром внутреннего сечения 3 мм. Световод устанавливали на расстоянии 1 мм от поверхности черепа, на 2 мм роstralнее брегмы и на 2 мм латеральнее са-

гитального шва. Облучение проводили в течение 15 мин с каждой стороны [3]. Ложнооперированных животных подвергали тем же процедурам, за исключением введения бенгальского розового. Фоточувствительный краситель при взаимодействии со светом длиной волны 560 нм выделяет свободный кислород, что приводит к повреждению эндотелия микрососудов коры и тромбообразованию.

АТ-ГЛ получали от кроликов, иммунизированных по стандартной схеме конъюгатом глутамат — бычий сывороточный альбумин (БСА), синтезированным модифицированным методом с помощью бифункционального реагента глутаральдегида. Титр Глу-АТ, определяемый методом иммуноферментного анализа (ИФА), составил 1:1000. γ -глобулиновые фракции из сывороток иммунизированных и интактных кроликов выделяли методом переосаждения сульфатом аммония, очищали от БСА методом аффинной хроматографии, лиофилизировали и хранили при 4°C [17].

Содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга крыс (префронтальной коре, гиппокампе) определяли на 1-е и 8-е сутки после фототромбоза методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [13] (ионпарная хроматография) с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД) на хроматографе LC-304T (BAS, West Lafayette, США) с инжектором Rheodyne 7125. Изучаемые вещества разделяли на обращенно-фазной колонке Rego-Sil-Pur, ODS-3, 4x100 мм, размер частиц 3 мкм (Dr. Majsch GmbH, «Элсико», Москва). Насос RM-80 (BAS, США), скорость элюции подвижной фазы 1,0 мл/мин, при давлении 2 атм. Мобильная фаза: 0,1 М цитратно-фосфатный буфер, содержащий 1,1 мМ октансульфоновой кислоты, 0,1 мМ ЭДТА и 9% ацетонитрила (рН 3,0). Измерение проводили на стеклоугольном электроде (+0,85 V) против электрода сравнения Ag/AgCl. Подвижную фазу фильтровали с помощью вакуумного насоса через целлюлозные фильтры (диаметр пор 0,2 мкм) при P = 20-40 мм Hg столба и перед каждым хроматографическим определением тщательно дегазировали под вакуумом с одновременной обработкой на ультразвуковой бане («Серьга», Россия) в течение 40-50 с. Для определения количества моноаминов в структурах мозга крыс использовали раствор, содержащий в качестве внутреннего стандарта диоксибензиламин (ДОБА), 3,4-дигидроксифенилуксусную кислоту (ДОФУК), дофамин (ДА), 5-гидрокситриптамин (5-ОТ), 5-оксииндолуксусную кислоту (5-ОИУК) в концентрации 500 пкмоль/мл. Величины концентрации моноаминов в опытных образцах рассчитывали методом «внутреннего стандарта», исходя из отношений площадей пиков в стандартной смеси и в образце, и выражали в нмоль/г ткани.

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

Результаты и обсуждение

Ранее было показано, что двусторонний фототромбоз сосудов префронтальной коры головного мозга крыс приводит к формированию ишемического очага и сопровождается изменениями метаболизма

моноаминов в коре и в подкорковых структурах, что неизменно сказывается на мнестических функциях мозга, приводя к нарушению воспроизведения и сохранения выработанных навыков [3, 15, 18].

В данной работе было выявлено значительное повышение уровня дофамина (ДА) в префронтальной коре головного мозга в первые сутки после фототромбоза коры, как в группе, получавшей NaCl 0,9% Н (3, N = 24) = 10,49, $p = 0,0148$, так и при введении АТ-ГЛ Н (3, N = 24) = 12,66, $p = 0,0054$ (рис. 1). Однако к 8-м суткам уровень дофамина во всех исследуемых группах животных снижался. Оборот дофамина

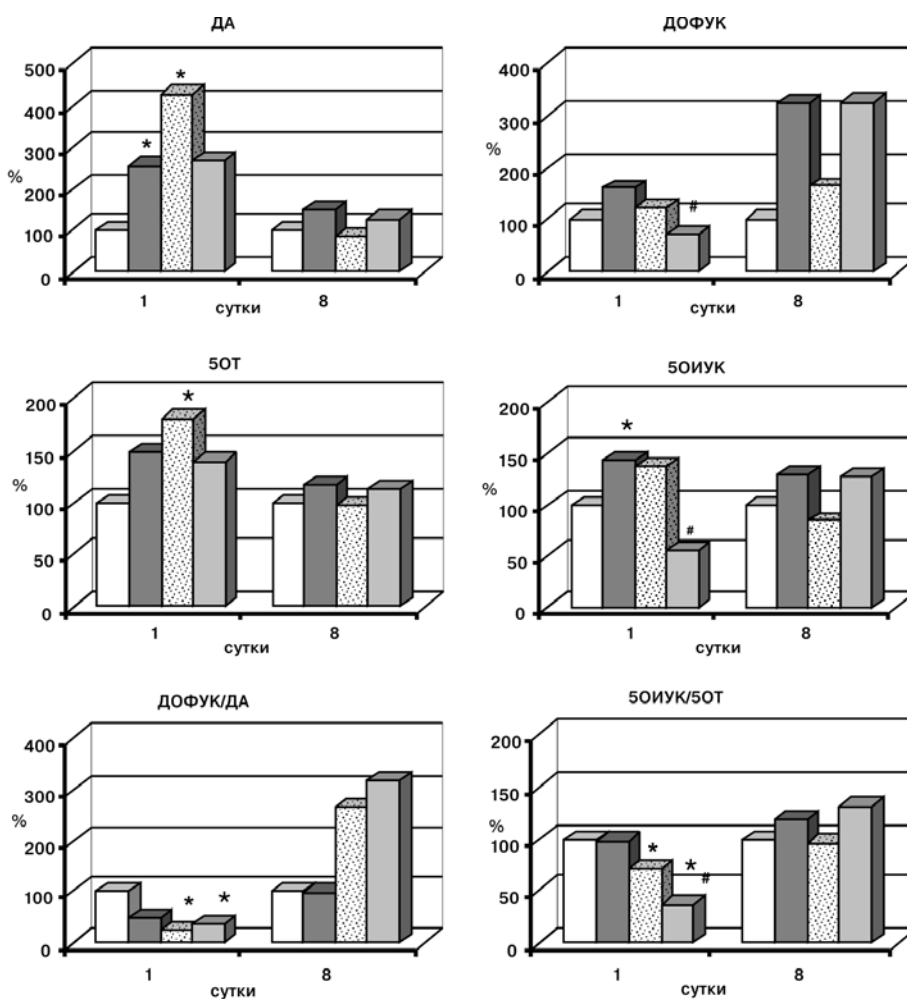


Рис. 1. Влияние антител к глутамату на содержание моноаминов в префронтальной коре после двустороннего фототромбоза префронтальной коры головного мозга крыс.

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

Белые столбики — ложнооперированные животные +0,9% NaCl.

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

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

(ДОФУК/ДА) в первые сутки после фототромбоза коры достоверно снижался как в ишемизированной группе, так и в группах, получавших АТ-ГЛ и γ -глобулин. $H(3, N = 24) = 9,01, p = 0,0291$ и $H(3, N = 24) = 12,80, p = 0,0051$, а к 8-м суткам оборот дофамина имел тенденцию к увеличению в ишемизированной группе с введением АТ-ГЛ и с введением гамма-глобулина.

Уровень серотонина(5-ОТ) в префронтальной коре в первые сутки после ишемии повышался во всех экспериментальных группах. Достоверно повышался уровень 5-ОИУК в ишемизированной группе и группе с введе-

нием АТ-ГЛ, В группе с введением гамма-глобулина в этот срок уровень метаболита 5-ОИУК был достоверно ниже, чем в ишемизированной. Уровень метаболита 5-ОИУК к восьмым суткам после ишемического повреждения оставался выше контроля в ишемизированной группе без лечения и группе с введением гамма-глобулина. Оборот серотонина (5ОИУК/5ОТ) в первые сутки снижался в группах, получавших АТ-ГЛ и γ -глобулин. На 8-е сутки показатели уровня серотонина (5ОТ) и его оборота (5ОИУК/5ОТ) во всех исследуемых группах не отличался от контроля.

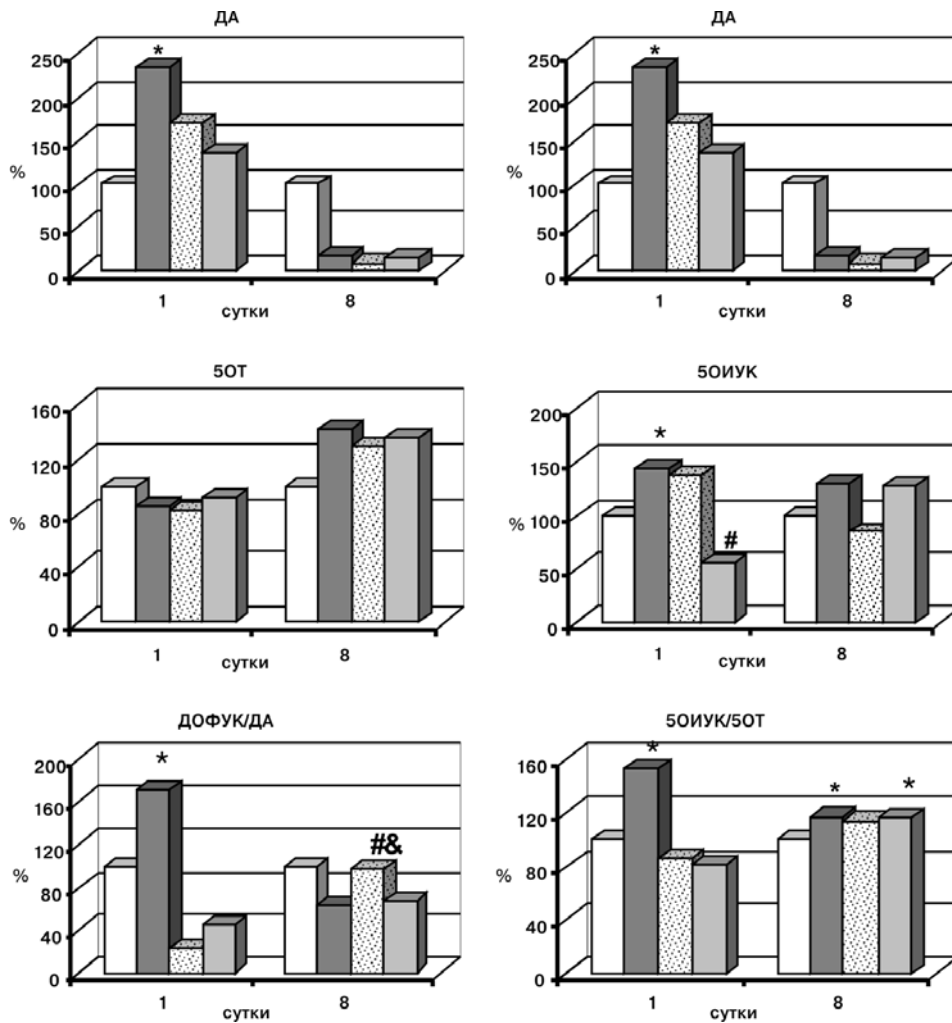


Рис. 2. Влияние антител к глутамату на содержание моноаминов в гиппокампе после двустороннего фототромбоза префронтальной коры головного мозга крыс.

По оси абсцисс обозначены сутки после двустороннего фототромбоза префронтальной коры головного мозга крыс; По оси ординат показано содержание моноаминов в гиппокампе головного мозга крыс в процентах. Содержание моноаминов в контрольной группе ложнооперированных крыс принято за 100%. Белые столбики – ложнооперированные животные +0,9% NaCl; темно-серые столбики – крысы с ишемическим повреждением префронтальной коры + 0,9% NaCl, заштрихованные столбики – крысы с ишемическим повреждением префронтальной коры + АТ-Глу 250 мкг/кг, светло-серые столбики – крысы с ишемическим повреждением префронтальной коры + гамма-глобулин от интактных кроликов 250 мкг/кг.

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

Как видно из рис. 2, в гиппокампе в первые сутки после фототромбоза у ишемизированных животных, получавших NaCl 0,9%, достоверно повышался уровень ДА Н ($3, N = 24$) = 12,53, $p = 0,0057$. Эта тенденция сохранялась в группах с введением АТ-ГЛ и γ -глобулина. Оборот ДА (ДОФУК/ДА) в первые сутки у ишемизированных животных, получавших NaCl 0,9%, достоверно повышался и имел тенденцию к значительному снижению в группах с введением АТ-ГЛ и γ -глобулина. К 8-м суткам уровень ДА был резко снижен во всех группах по отношению к ложнооперированному контролю, тогда как оборот (ДОФУК/ДА) к 8-м суткам возрастал в группе получавшей АТ-ГЛ по отношению к ишемизированной группе без лечения. Уровень 5-ОТ в гиппокампе во всех экспериментальных группах в первые сутки после ишемического повреждения префронтальной коры не отличался от контрольного. К 8-м суткам эти показатели имели тенденцию повышения по отношению к контролю. Значительно менялся уровень метаболита серотонина 5ОИУК: этот показатель был в первые сутки после ишемического повреждения коры достоверно выше контроля в ишемизированной группе по отношению к ложнооперированному контролю и достоверно ниже в группе с введением γ -глобулина в сравнении с группой с ишемическим повреждением без лечения. К восьмым суткам уровень метаболита 5-ОИУК оставался в указанных группах повышенным по сравнению с контрольными значениями. Оборот серотонина (5-ОИУК/5ОТ) в гиппокампе в первые сутки возрастал в группе с ишемическим повреждением по сравнению с контролем. На 8-е сутки оборот серотонина незначительно отличался от контроля во всех группах.

Механизмы патологических процессов, происходящих при ишемическом инсульте и влияние на них нейропротекторов подробно изучены в исследованиях на животных, у которых экспериментально вызывали ишемию мозга. В настоящее время выявлена сложная цепь метаболических и клеточных реакций, вызываемых нарушениями мозгового кровообращения [7, 11].

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, 7].

Новым приоритетным направлением в разработке противоишемической защиты является использование методов нейроиммунологии. Антитела к нейромедиаторам в настоящее время становятся объектом исследований при изучении проблемы регуляции нейроиммунных взаимодействий, составляющих основу функциональных нарушений при ишемических поврежде-

ниях головного мозга. Особое значение в этих процессах приобретает роль глутамата, исследуемая с помощью антител к нему [4, 14, 17]. Дисбаланс глутаматергической нейромедиации при ишемическом повреждении мозга приводит к развитию каскада эксайтотоксичности, в ходе которого наблюдается гибель нейронов прежде всего в префронтальной коре и гиппокампе. Необходимо отметить и тот факт, что гиппокамп имеет прямую эфферентную связь с префронтальной корой [8-10].

Установлено, что интраназальное однократное введение АТ-ГЛ (250 мкг/кг) через 1 час после фотоиндуцируемого тромбоза сосудов префронтальной коры головного мозга крыс приводит на 8-е сутки после операции к снижению содержания глутамата в префронтальной коре и гиппокампе и не влияет на содержание аспартата в этих структурах, что свидетельствует о специфическом нормализующем действии АТ-ГЛ на усиленную продукцию глутамата [4, 14].

Полученные ранее данные показали выраженное протективное действие АТ-ГЛ при нейродегенеративном повреждении когнитивных функций мозга, возможно, благодаря их способности снижать усиленную продукцию глутамата и тем самым предотвращать гибель нейронов, что позволяет также объяснить антиамнестические эффекты АТ-ГЛ при остром ишемическом повреждении префронтальной коры. Поскольку в процессах обучения и памяти ключевую роль играют нейромедиаторные взаимодействия, то можно предположить, что изменения уровня моноаминов в префронтальной коре и гиппокампе являются отражением перестройки пластических процессов, происходящих в условиях снижения эксайтотоксичности под действием АТ-ГЛ в исследуемых структурах ишемизированного головного мозга.

Список литературы

1. *Ашмарин И.П., Стукалов П.В.*, Нейрохимия. — М.: Изд-во Инст. Биомед. Химии РАНН, 1966. — С. 87-117.
2. *Гусев Е.И., Скворцова В.И.* Ишемия головного мозга. — М., 2001. — С. 328.
3. *Романова Г.А.* Дизрегуляторные нарушения интегративной деятельности мозга при фокальной ишемии коры // *Дизрегуляторная патология* / Под ред. Г.Н. Крыжановского. — М., 2002. — С. 605-615.
4. *Романова Г.А., Шакова Ф.М., Горбатов В.Ю.* и др. // *БЭБиМ.* — 2010. — Т. 149, №3. — С. 261-264.
5. *Скворцова В.И., Стаховская Л.В., Айрян Н.Ю.* Эпидемиология инсульта в Российской Федерации // *Consilium Medicum.* — 2005. — №1. — С. 10-12.
6. *Degenetais E., Thierry A.M., Glowinski J.* Synaptic influence of hippocampus on pyramidal cells of the rat prefrontal cortex: an in vivo intracellular recording study // *Life Sci Med.* — 2003. — Vol. 13(7). — P.782-792.

7. **Ginsberg M.D.** Neuroprotection for ischemic stroke: Past, present and future // *Neuropharm.* — 2008. — Vol. 55. — P. 363-389.
8. **Goldman-Rakic P.S., Selemon L.D., Schwartz M.L.** Dual pathways connecting the dorsolateral prefrontal cortex with the hippocampal formation and parahippocampal cortex in the rhesus monkey // *Neurosci.* — 1984. — Vol. 12. — P. 719-743.
9. **Kolb B.** Function of the cortex of the rat: a comparative review // *Brain Res Rev.* — 1984. — Vol. 8. — P. 65-98.
10. **Lee I., Kesner R.P.** Time-dependent relationship between the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex in spatial memory // *J. Neurosci.* — 2003. — Vol. 23. — P. 1517-1523.
11. **Mattson M.P., Culmsee C., Yu Z.F.** Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke // *Cell Tiss Res.* — 2000. — Vol. 301. — P. 173-187.
12. **Paxinos G., Watson C.** Atlas of anatomy of rat brain // *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* — 3rd San Diego, Calif. Academic Press Inc; 1997.
13. **Pearson S.J., Crudek C., Mercer K.** et al. // Electrochemical detection of human brain transmitter amino acids by high-performance liquid chromatography of stable o-phthalaldehyde-sulphite derivatives // *J. Neural Transm.* — 1991. — Vol. 86. — P. 151-157.
14. **Romanova G.A., Gorbatov V.Y., Shakova F.M.** Effect of antibodies to glutamate on retention of conditioned passive avoidance response in rats with ischemic injury of the prefrontal cortex // *Bull. Exp. Biol. Med.* — 2012. — Vol.153(1). — P. 12-15.
15. **Romanova G.A., Silachev D.N., Shakova F.M.** Neuroprotective and anti-amnesic actions of Semax in experimental ischemic cerebral cortical infarct // *Bull. Exp. Biol. Med.* — 2006. — Vol. 142(12). — P. 612-628.
16. **Rother J.** Neuroprotection does not work // *Stroke.* — 2008. — Vol. 39. — P. 523-524.
17. **Seguela P., Geffard M., Buijs R., Le Moal M.** // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984. — Vol. 81, №12. — P. 3888-3892.
18. **Silachev D.N., Shram S.I., Shakova F.M., Romanova G.A.** Formation of spatial memory in rats with ischemic lesions to the prefrontal cortex; effects of a synthetic analog of ACTH(4-7) // *Neurosci Beh. Phys.* — 2009. — Vol. 8. — P. 749-757.
19. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* 3rd.ed. / Paxinos G., Watson C. — San Diego, 1997.

Поступила 10.12.13

Сведения об авторах:

Шакова Фатимат Мухамедовна — к.м.н., с.н.с. лаборатории ишемических повреждений мозга ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН»

Клодт П.М. — к.б.н., в.н.с. лаборатории нейрохимической фармакологии ФГБУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» РАМН

Кудрин В.С. — к.м.н., зав. лаб. нейрохимической фармакологии ФГБУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» РАМН

Давыдова Т.В. — д.м.н., гл.н.с. лаборатории нейроиммунопатологии ФГБУ НИИОПП РАМН

Романова Г.А. — д.б.н., проф., зав. лаб. ишемических повреждений мозга ФГБУ НИИОПП

Н.А. Лычева^{1,2}, И.И. Шахматов^{1,2}, В.М. Вдовин^{1,2}, В.И. Киселёв^{1,2}

Устранение активирующего влияния психоэмоционального стресса на гемостаз действием мягкой гипотермии

¹ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, 656038, г.Барнаул, пр. Ленина, 40

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «НИИ физиологии и фундаментальной медицины» СО РАМН, 656031, г.Барнаул, ул. Папанинцев, 126

Исучено состояние системы гемостаза при психоэмоциональном и гипотермическом воздействии на крыс. Показано, что психоэмоциональное воздействие сопровождается гиперкоагуляцией. «Чистый» эффект гипотермии характеризуется гипокоагуляцией и активацией фибринолиза. Таким образом, в работе показано, что более выраженное влияние на систему гемостаза оказывает общее переохлаждение в водной среде, чем психоэмоциональное воздействие.

Ключевые слова: психоэмоциональный стресс, гипотермия, гемостаз

N.A. Lycheva^{1,2}, I.I. Shahmatov^{1,2}, V.M. Vdovin^{1,2}, V.I. Kiselev^{1,2}

Elimination of the activating influence of emotional stress on hemostasis mild hypothermia action

¹ Altai State Medical University

² Institute of Physiology and Fundamental Medicine RAMS

The state of the hemostatic system in the psycho-emotional and hypothermia in rats. It is shown that the psycho-emotional impact is accompanied by a hypercoagulable. «Clean» effect of hypothermia is characterized by the activation of anticoagulation and fibrinolysis. Thus, we have shown that the general hypothermia in the aquatic environment has a more pronounced effect on the hemostatic system than the psycho-emotional impact.

Key words: psycho-emotional stress, hypothermia, hemostasis

Гипотермия оказывает генерализованное воздействие на организм, являясь не только естественным фактором внешней среды, но и искусственно создаваемой средой, используемой в практической медицине. При этом гипотермия, обладая выраженными нейропротективными свойствами, используется как тренирующий фактор [4], а также является обязательным условием при проведении операций на открытом сердце [8], важным компонентом комплексной терапии неотложных состояний [10, 11].

Однако при чрезмерно длительном или интенсивном воздействии на организм гипотермия способна вызывать различные нарушения метаболизма и повреждение внутренних органов. Развитие полиорганной недостаточности, наблюдаемое при гипотермии, связывают, прежде всего, с нарушением микроциркуляции [7]. Основной системой, обеспечивающей адекватное реологическое состояние крови, является система гемостаза. В то же время, имеющиеся в литературе данные не позволяют составить целостного представления о зависимости между степе-

нью и режимом гипотермического воздействия и выраженностью и направленностью ответных реакций организма.

Цель работы — исследование реакции системы гемостаза в условиях мягкой гипотермии [1].

Методика

Исследования выполнены на 50 лабораторных крысах линии Wistar. Однократная иммерсионная гипотермия моделировалась путем помещения животных, находящихся в индивидуальных клетках, в емкости с водой на глубину 4,5 см при температуре воды 5°C, воздуха 7°C [6]. Животные находились в камере до достижения ректальной температуры 32—35°C. Время экспозиции было индивидуальным и в среднем составляло 20±8 мин. В качестве контрольных выступали животные, помещаемые в индивидуальных клетках в воду температурой 30°C на время, соответствовавшее времени нахождения опытной группы. Для получения референсных значений системы гемостаза была исследована кровь 30 интактных животных.

Забор крови у животных обеих групп осуществлялся сразу после извлечения из воды. Кровь для исследования в объеме 5 мл получали путем забора из печеночного синуса в полистироловый шприц, содержащий 0,11 М (3,8%) раствора цитрата натрия (соотношение крови и цитрата 9:1).

На протяжении недельной адаптации к условиям вивария все крысы находились в стандартных условиях содержания, предусмотренных требованиями Всемирного общества защиты животных (WSPA) и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных.

У всех животных исследовались показатели тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза, а также антикоагулянтная и фибринолитическая активность плазмы [3] с помощью наборов фирмы «Технология-Стандарт» (Россия). Анализ показателей периферической крови производился при помощи гематологического анализатора «Drew-3» (США).

Сравнение полученных результатов осуществляли путем вычисления средних значений и ошибки среднего. Статистический анализ выполнен с использованием непараметрических методов (U-критерий Манна—Уитни) на персональном компьютере с использованием па-

Таблица

Коагулограмма крыс после воздействия однократной мягкой гипотермии ($M \pm m$)

Показатели	Интактные животные (1), n = 30	Контроль (2), n = 12	Опыт (3), n = 12	p
Количество лейкоцитов, 10^9 /л	4,2 ± 0,3	3,3 ± 0,2	4,0 ± 0,4	p ₁₋₃ > 0,05 p ₁₋₂ > 0,05 p ₂₋₃ < 0,05
Количество эритроцитов, 10^{12} /л	4,5 ± 0,3	6,45 ± 0,09	6,1 ± 0,07	p ₁₋₃ > 0,05 p ₁₋₂ < 0,05 p ₂₋₃ < 0,05
Гематокрит, %	23,6 ± 1,3	31,3 ± 0,3	29,8 ± 0,4	p ₁₋₃ > 0,05 p ₁₋₂ < 0,05 p ₂₋₃ > 0,05
Количество тромбоцитов, 10^9 /л	379,8 ± 32,3	522,6 ± 16,6	553,7 ± 16,3	p ₁₋₃ < 0,05 p ₁₋₂ < 0,05 p ₂₋₃ < 0,05
Агрегация, %	28,6 ± 2,3	11,4 ± 3,3	4,8 ± 1,1	p ₁₋₃ < 0,05 p ₁₋₂ < 0,05 p ₂₋₃ < 0,05
Силиконовое время, с	272,1 ± 20,1	113,7 ± 15,6	218,3 ± 8,9	p ₁₋₃ > 0,05 p ₁₋₂ < 0,05 p ₂₋₃ < 0,05
Активированное частичное тромбопластиновое время, с	17,2 ± 0,4	13,9 ± 1,0	22,5 ± 2,0	p ₁₋₃ < 0,05 p ₁₋₂ < 0,05 p ₂₋₃ < 0,05
Протромбиновое время, с	22,3 ± 0,9	22,6 ± 0,5	32,8 ± 2,8	p ₁₋₃ < 0,05 p ₁₋₂ > 0,05 p ₂₋₃ < 0,05
Эхитоксовое время, с	23,7 ± 1,3	24,3 ± 0,5	36,1 ± 1,1	p ₁₋₃ < 0,05 p ₁₋₂ > 0,05 p ₂₋₃ < 0,05
Растворимые фибриномономерные комплексы, мг/100 мл	3,3 ± 0	3,0 ± 0	3,0 ± 0	p ₁₋₃ > 0,05 p ₁₋₂ > 0,05 p ₂₋₃ > 0,05
Фибриноген, г/л	1,8 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1	p ₁₋₃ > 0,05 p ₁₋₂ > 0,05 p ₂₋₃ > 0,05
Антитромбин III, %	96,1 ± 3,7	113,7 ± 2,1	81,2 ± 4,5	p ₁₋₃ > 0,05 p ₁₋₂ > 0,05 p ₂₋₃ < 0,05
Эуглобулиновый фибринолиз, мин	498,4 ± 34,8	487,0 ± 37,9	228 ± 20,4	p ₁₋₃ < 0,001 p ₁₋₂ > 0,05 p ₂₋₃ < 0,001

Примечание. n — число наблюдений; p — уровень статистической значимости различий сравниваемых показателей. Для определения статистической значимости различий в группах применялся непараметрический U-критерий Манна—Уитни.

кета прикладных статистических программ Statistica 6.0 (StatSoft, США). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

В таблице приведены данные показателей гемостаза и периферической крови интактной, контрольной и опытной групп животных.

При сравнении интактной и контрольной групп оценивалось влияние эмоционального стресса, возникающего у животных при помещении их в несвойственные им условия среды. Помещение животных в теплую воду сопровождалось повышением количества эритроцитов на 43% ($p < 0,05$) и увеличением гематокритного показателя на 32% ($p < 0,05$). При оценке состояния сосудисто-тромбоцитарного гемостаза выявлено увеличение числа кровяных пластинок на 37% и снижение их агрегационной способности на 60% ($p < 0,05$). Кроме того, психоэмоциональный стресс сопровождался развитием гиперкоагуляционного сдвига, выражающегося укорочением силиконового времени и активированного парциального тромбопластинового времени свертывания на 60% и 20% соответственно ($p < 0,05$). Наблюдаемые нами изменения в системе гемостаза согласуются с данными литературы, в которых описывается активирующее влияние острого психоэмоционального стресса на коагуляционную систему [9].

Изолированное влияние гипотермии было показано при сравнении результатов, полученных у контрольной и опытной групп животных, подвергавшихся иммерсионному погружению при различных температурных режимах.

«Чистый эффект» гипотермии со стороны периферической крови проявлялся в снижении количества эритроцитов на 6% ($p < 0,05$). Кроме того, наблюдалось содружественное увеличение количества лимфоцитов и тромбоцитов на 21% и 5% соответственно ($p < 0,05$). Агрегационная способность тромбоцитов при данной степени гипотермии снижалась в 2 раза ($p < 0,05$).

Со стороны плазменного гемостаза наблюдалась гипокоагуляция на всех этапах свертывания крови. Угнетение контактной фазы характеризовалось удлинением силиконового времени свертывания на 91% ($p < 0,05$). Гипокоагуляционный сдвиг по внешнему и внутреннему пути характеризовался удлинением протромбинового и активированного парциального тромбопластинового времени свертывания на 45% и 61% соответственно ($p < 0,05$). Эхитоксовое время, характеризующее конечный этап свертывания, удлинялось на 48% ($p < 0,05$).

Уровень антитромбина III, характеризующий состояние антикоагулянтной системы, в ходе опытного воздействия снижался на 30% ($p < 0,05$). При этом активность фибринолитической системы возрастала на 64% ($p < 0,001$).

Выявленные нами изменения, зарегистрированные в условиях мягкой гипотермии в периферической крови, находят подтверждение в литературных источниках. Так, по данным многих авторов, снижение количества эритроцитов под действием охлаждения наблюдается вследствие развития гемолитических процессов, так как гипотермия приводит к снижению осмотической резистентности красных кровяных телец [2]. Тенденция к содружественному увеличению количества лимфоцитов и тромбоцитов объясняется целесообразностью такого реагирования иммунокомпетентных клеток и кровяных пластинок для улучшения адгезии последних и улучшения миграционной способности лейкоцитов [5].

Развитие гипокоагуляционных сдвигов при действии гипотермии объясняется повышением активности ингибиторов сериновых протеаз [2]. Ранее также показано активирующее влияние гипотермии на фибринолитическую систему за счет увеличения активности плазминогена [12].

Сочетанное влияние психоэмоционального напряжения и гипотермии оценивалось при сравнении результатов, полученных у интактных и опытных животных. Комплексное воздействие стрессирующих факторов сопровождалось существенными изменениями в изучаемых системах. Так, оценка состояния сосудисто-тромбоцитарного гемостаза показала, что совокупность исследуемых воздействий вызывала увеличение числа кровяных пластинок на 45% ($p < 0,05$) и снижение их агрегационных свойств в 6 раз ($p < 0,05$).

При оценке плазменного гемостаза выявлялся гипокоагуляционный сдвиг как в состоянии внутреннего, так и внешнего путей свертывания. Так активированное парциальное тромбопластиновое время удлинялось на 14% ($p < 0,05$), а протромбиновое время — на 47% ($p < 0,05$). При сравнении показателей, отражающих конечный этап свертывания, регистрировалось смещение гемостатического потенциала плазмы в сторону гипокоагуляции (по данным теста эхитоксового времени свертывания, удлинявшегося на 52% ($p < 0,05$)).

Противосвертывающая система при данном режиме гипотермии не изменяла своей активности. При этом активность фибринолитической системы, оцениваемая по времени спонтанного лизиса эуглобулинов, увеличивалась вдвое ($p < 0,001$).

Таким образом, анализируя данные, полученные в ходе экспериментов, можно отметить, что смещение гемостатического потенциала в сторону гиперкоагуляции, вызванное психоэмоциональным напряжением, нивелируется гипотермическим воздействием. Так, при последовательном рассмотрении влияния гипотермии и психоэмоционального стресса на гемостаз были выявлены разнонаправленные изменения. Количество эритроцитов под действием психоэмоционального стресса возрастало, а при действии гипотермии снижалось. Вслед-

ствии этого сравнение данных, полученных у интактной и опытной групп животных, не сопровождалось достоверными различиями по этому показателю. Подобные разнонаправленные изменения наблюдались и при оценке показателя, характеризующего стадию контактной активации. В то же время под действием стрессирующих факторов наблюдаются и однонаправленные изменения в изучаемой системе. Так, агрегационная способность тромбоцитов снижалась по сравнению с интактной как в группе, подвергавшейся психоэмоциональному, так и термическому стрессу.

Таким образом, результаты экспериментов показали, что общее переохлаждение в водной среде оказывает более выраженное влияние на систему гемостаза, чем психоэмоциональное воздействие. Гипокоагуляция, регистрируемая при общем переохлаждении организма, обусловленная угнетением ферментативной активности компонентов плазменного гемостаза, проявляется даже на фоне активирующего влияния на гемостаз катехоламинов, выбрасываемых при психоэмоциональном стрессе.

Кроме того, в нашем исследовании подтверждено активирующее влияние гипотермии на фибринолитическую систему. Таким образом, суммарное изменение компонентов в системе гемостаза, характеризующееся снижением коагуляционной и повышением фибринолитической активности, снижающее (в совокупности) тромбогенный потенциал стрессированных животных, является важной особенностью системы гемостаза, выявленной в ходе описанных экспериментов, что необходимо учитывать при воздействии острой общей гипотермии на организм.

Список литературы

1. *Алябьев Ф.В., Парфирьева А.М., Чесалов Н.П., Шамарин Ю.А.* и др. Функционально-морфологические изменения сердца при гипотермии. — Сибирский медицинский журнал. — 2008. — №1. — С. 68-71.

2. *Гусакова Е.А., Городецкая И.А.* Стресс и протеолитические ферменты лизосом. — Вестник ВГМУ. — 2012. — Т. 11, №4. — С. 15 — 25.

3. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза / Баркаган З.С., Момот А.П. — М.: Ньюдиамед-АО, 2008. — 292 с.

4. *Дикий Б.В.* Перспективы использования закаливания природно-климатическими факторами в целях реабилитации соматических заболеваний // Физическое воспитание студентов. — 2009. — №3. — С. 12-15.

5. *Михайлюченко М.И., Шаповалов К.Г., Витковский Ю.А.* Лимфоцитарно-тромбоцитарные взаимодействия у больных с холодовой травмой. — Забайкальский вестник. — 2006. — №2. — С. 19-21.

6. *Северина Т.Г., Кубарко А.П.* Влияние острой иммерсионной гипотермии на температуру тела и активность лизосомальных ферментов печени устойчивых и неустойчивых к холоду крыс. — Медицинский журнал — 2009. — №2. — С. 112-115.

7. *Степанян Ю.С.* К вопросу о микрогемодиализации в железах внутренней секреции при гипотермии. — Проблемы экспертизы в медицине. — 2009. — Т. 09, №34. — С. 25-27.

8. *Цветовская Г.А., Караськов А.М., Князькова Л.Г.* Стратегия биохимической адаптации при кардиохирургических вмешательствах. — Патология кровообращения и кардиохирургия. — 1998. — №1. — С. 45-46.

9. *Шахматов И.И.* Влияние однократной иммобилизации различной интенсивности на реакции системы гемостаза. — Бюллетень СО РАМН. — 2011. — Т. 31, №4. — С. 33-36.

10. *Шевелев О.А., Бутров А.В., Каленова И.Е.* Терапевтическая гипотермия — метод нейропротекции при ишемическом инсульте. — Российский Медицинский Журнал. Хирургия. — 2012. — №18. — С. 893 — 895.

11. *Шевелев О.А., Бутров А.В.* Технология лечебной гипотермии в интенсивной терапии и реаниматологии. — Неотложная медицина. — 2010. — №3. — С. 12-15.

12. *Staikou C., Paraskeva A., Drakos E., Anastassopoulou I., Papaioannou E., Donta I., Kontos M.* Impact of graded hypothermia on coagulation and fibrinolysis. — Journal of surgical research. — 2011. — №1. — P. 125-130.

Поступила 20.11.13

Сведения об авторах:

Лычёва Наталья Александровна, преподаватель кафедры нормальной физиологии ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, младший научный сотрудник ФГБУ «НИИ физиологии и фундаментальной медицины» СО РАМН

Шахматов Игорь Ильич, д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии, ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, старший научный сотрудник ФГБУ «НИИ физиологии и фундаментальной медицины» СО РАМН

Вдовин Вячеслав Михайлович, к.м.н., доцент кафедры нормальной физиологии, ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России старший научный сотрудник ФГБУ «НИИ физиологии и фундаментальной медицины» СО РАМН

Киселев Валерий Иванович, д.м.н., проф., член-корр. РАМН, заведующий кафедрой нормальной физиологии ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России; зав. лабораторией ФГБУ «НИИ физиологии и фундаментальной медицины» СО РАМН

М.В. Баранов¹, Е.Н. Архипова², М.А. Лебедева², Н.Н. Хлебникова², Ю.С. Медведева²

Особенности фармакокинетики цефтриаксона в условиях антиортостатической гипокинезии у крыс

¹ Научно-исследовательский институт космической медицины Федерального государственного бюджетного учреждения Федерального научно-клинического центра Федерального медико-биологического агентства России. 115682 Москва, Ореховый бульвар, д. 28

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

В рамках данной работы проведен эксперимент по определению особенностей фармакокинетики препарата цефтриаксон в условиях моделирования эффектов микрогравитации у крыс. В двух экспериментальных группах: опытной и контрольной проведен сравнительный анализ фармакокинетических параметров и установлено влияние на фармакокинетику цефтриаксона — антиортостатической гипокинезии (АНОГ). В опытной группе выявлено снижение максимальной концентрации цефтриаксона и его биодоступности при однократном внутримышечном (в/м) введении по сравнению с контрольной группой. При этом увеличивалась скорость всасывания препарата.

Ключевые слова: микрогравитация, фармакокинетика, цефтриаксон, крысы

M.V. Baranov, E.N. Arkhipova, M.A. Lebedeva, N.N. Khlebnikova, Yu.S. Medvedeva

Features of the pharmacokinetics of ceftriaxone during the antiorthostatic hypokinesia in rats

This study was designed to investigate the effects of simulated microgravity on the plasma kinetics of ceftriaxone in rats. Comparative analysis of pharmacokinetic parameters in control and experimental groups has revealed the influence of antiorthostatic hypokinesia (ANOH) on the pharmacokinetics of ceftriaxone. Decreased level of maximum plasma concentration (C_{max}) and bioavailability of ceftriaxone after single intramuscular (IM) injection were revealed in rats with antiorthostatic hypokinesia. The rate of absorption of the drug was higher respectively.

Key words: microgravity, pharmacokinetic, ceftriaxone, rats

В ходе экспериментальных работ, посвященных особенностям развития патологических процессов в условиях моделирования эффектов невесомости, были выявлены определенные качественные и количественные отличия в патогенезе таких заболеваний как перитонит и острый панкреатит.

Выявлено, например, что развитие перитонита на фоне антиортостатической гипокинезии (АНОГ) сопровождается более выраженными деструктивными изменениями в поджелудочной железе и менее выраженным поражением печени, чем при развитии воспалительного процесса в условиях вивария [1]. Помимо морфологических изменений определенным образом меняются биохимические показатели крови [5]. Особенности патогенеза связаны, в первую очередь, с определенными сдвигами в организме, происходящими под действием модели микрогравитации. Перераспределение жидких сред в спланхническом бассейне, перестройка кровообращения, как на уровне сис-

темной гемодинамики, так и на уровне микроциркуляции, изменения в иммунной, эндокринной и других системах — все это может влиять на развитие заболеваний в условиях космических полетов [2].

Однако нельзя не учитывать, что помимо особенностей патогенеза патологического процесса на терапию будут влиять особенности фармакокинетики и фармакодинамики лекарственных препаратов.

Установлено, что в условиях невесомости меняется физиологический баланс жидкостей и электролитов, уровень метаболизма и гормональный профиль. Эти и ряд других изменений способны серьезно изменить как фармакокинетику, так и фармакодинамику лекарственных веществ.

Проблемой влияния факторов космического полета на фармакокинетику отдельных лекарственных препаратов начали заниматься достаточно давно как в рамках советских, а впоследствии, и российских научных программ, так и за рубежом [4, 6, 8, 9]. Име-

ются данные о том, что отдельные препараты, использованные в космосе не производят того же действия, которое наблюдалось на Земле [10].

Вместе с тем, информации о влиянии факторов космического полета на фармакокинетику лекарственных препаратов за время проведения космических исследований в этой области, получено явно недостаточно.

Как установлено, за период многолетних медицинских наблюдений за состоянием здоровья экипажей пилотируемых орбитальных станций и космических кораблей, одним из наиболее вероятных медицинских событий в условиях космического полета является воспалительный процесс [3, 7, 11]. В связи с чем исследование влияния эффектов микрогравитации на фармакокинетику антибактериальных препаратов приобретает особый интерес.

Исследование антибактериальных препаратов позволит не только установить общие закономерности влияния невесомости на фармакокинетику препаратов, но и вплотную подойти к выбору оптимальных схем лекарственной терапии воспалительных процессов в условиях космических полетов.

Цель исследования — оценка фармакокинетики препаратов для этиотропной терапии инфекционного воспаления в условиях моделирования эффектов невесомости.

Методика

Исследование проводили на 200 беспородных крысах самцах массой 220—250 г. Крысы были разделены на 2 группы: опытную, в которой моделировали эффекты микрогравитации, и контрольную, находившуюся в условиях вивария. В каждой группе было по 100 животных. Крысы обеих групп получали стандартный пищевой рацион и в течение всего эксперимента имели свободный доступ к воде и пище. Масса животных опытной группы перед введением препарата составляла $208,9 \pm 4,1$ г, контрольной группы — $239,9 \pm 3,6$ г. В качестве модели воспалительного процесса нами был выбран перитонит — воспаление брюшины. Одной из наиболее употребляемых групп антибиотиков для эмпирической терапии острого перитонита являются цефалоспорины III поколения. Для эксперимента был выбран препарат этой группы — цефтриаксон. Он используется при большинстве неосложненных абдоминальных хирургических инфекций (прободная гастродуоденальная язва, острый холецистит, острый аппендицит, дивертикулит толстого кишечника, абсцесс печени) и даже при распространенном перитоните (первичном и вторичном), кроме послеоперационного.

Цефтриаксон выводится из организма в неизменном виде и не подвергается метаболизму, однако, его фармакокинетика может существенно меняться в условиях невесомости. Это может быть связано как с изменениями кровообращения в печени и почках, приводящим к сдвигам в элиминации препарата, так и с изме-

нениями протеома в условиях полета, поскольку цефтриаксон обладает высокой способностью связываться с белками плазмы крови.

Препарат вводили крысам однократно внутримышечно в дозе 0,0285 мг/г массы в мышцы правого бедра после обработки места инъекции антисептиком. Образцы плазмы крови крыс получали из лаборатории после декапитации животных. Животные как опытной, так и контрольной групп выводились из эксперимента через 15, 30, 45 мин, 1 ч, 1,5, 2, 3, 4, 6 и 8 ч с момента инъекции препарата. В каждой временной точке выводилось из эксперимента по 10 животных для получения статистически значимых результатов.

Методика моделирования микрогравитации

Эффекты микрогравитации достигались путем вывешивания крыс на специальном стенде на срок 7 сут. перед введением цефтриаксона.

Стенд представляет собой каркас на котором по двум направляющим рельсам перемещается балка с подвижной кареткой. Каретка может двигаться в любом направлении в пределах горизонтальной плоскости над сетчатым полом размером 40 на 40 см, под которым помещается поддон для сбора экскрементов. Для подвешивания животного к подвижной каретке в целях обеспечения равномерного распределения весовой нагрузки на туловище используется специальная система, состоящая из капронового костюма для крысы с отверстиями для конечностей. На спинке животного, в костюме, располагаются две металлические пластины, которые удерживают тело животного от провисания и позволяют придать избранный угол вывешивания для всего тела.

Для каждого животного, которому внутримышечно вводили цефтриаксон, определялись и рассчитывались следующие параметры:

C_{\max} — максимальная концентрация цефтриаксона (мкг/мл) в плазме крови;

t_{\max} — время достижения максимальной концентрации, ч;

MRT — среднее время удержания, ч;

AUC_{0-8} — площадь под кривой «концентрация-время» для препарата в интервале от 0 до 8 ч (в мкг*ч/мл для цефтриаксона);

$AUC_{0-\infty}$ — площадь под кривой «концентрация-время» для препарата в интервале от 0 до ∞ (в мкг*ч/мл для цефтриаксона);

k_{el} — константа скорости элиминирования препарата;

$T_{1/2}$ — период полувыведения препарата, ч;

MRT — время удержания препарата, ч.

Кроме того, усреднялись значения концентраций во все сроки наблюдения.

Все расчеты, проводили с помощью автоматизированной компьютерной программы «Резольвента»,

дисперсионный анализ «ANOVA», Statistica 6.0, Word, Excel и других специализированных компьютерных программ.

Для сравнительной фармакокинетической оценки показателей опытной и контрольной групп был проведен статистический анализ полученных данных.

В качестве основных переменных при этом были выбраны показатели AUC (площадь под кривой), T_{max} (время достижения максимальных концентраций), C_{max} (максимальная концентрация препарата в плазме крови) и C_{max}/AUC для соответствующих фармакокинетических кривых.

Моменты фармакокинетических кривых (AUC, MRT для заданного интервала времени 0—t) были рассчитаны по правилу трапеций. Период времени наблюдения t был равен 8 ч.

С помощью дисперсионного анализа (ANOVA; параметрический метод) оценивали различия между средними значениями фармакокинетических параметров двух групп животных после в/м введения препарата при 5% уровне значимости (* — $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой).

Количественную оценку цефтриаксона в плазме крови проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ детектированием.

Пробы для получения калибровочных кривых (спайки) готовили путем добавления известного количества стандарта определяемого соединения в интактную плазму крови.

Количественный анализ проводили методом абсолютной калибровки с использованием программного обеспечения «Galaxy» компании «VARIAN». Калибровочную зависимость получали в результате анализа проб плазмы с добавлением известного количества стандартов определяемого соединения.

Валидация методики количественного определения цефтриаксона в плазме методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ детектированием была проведена в соответствии с нормами GCP/CLP, руководством FDA для предприятий «Bioanalytical Method Validation» (Май 2011 г.) По результатам проведенной валидации чувствительность метода составила 0,5 мкг/мл. Воспроизводимость, точность и достоверность достигалась во всем интервале концентраций. Степень извлечения из плазмы крови составила 84,6%.

Анализ фармакокинетических данных произведен в соответствии с Методическими рекомендациями по проведению качественных клинических исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов МЗ РФ (2008) и In vivo bioequivalence guidances (U.S. Pharmacopeia 24 'NF 19, National Formulary, Supplement 1090, 2000).

Программа эксперимента была обсуждена и одобрена комиссией по биомедицинской этике ФГБУ НИИ ОПП РАМН.

Все манипуляции с животными производили в соответствии с требованиями Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ основных фармакокинетических параметров цефтриаксона в сравниваемых группах животных показал, что изучаемые препараты быстро всасываются из места введения с разной скоростью. Так параметр, характеризующий скорость всасывания — C_{max}/AUC_{0-8} , составил для опытной группы $0,576 \pm 0,0249^* \text{ ч}^{-1}$ и для контроля — $0,504 \pm 0,01558 \text{ ч}^{-1}$. Таким образом, скорость всасывания у опытной группы выше, чем у контроля.

Среднее значение времени достижения максимальной концентрации (T_{max}) составило для опытной группы $0,28 \pm 0,058^* \text{ ч}$, а для контрольной группы — $0,50 \pm 0,123 \text{ ч}$ с минимальным значением $T_{max} = 0,25 \text{ ч}$ для обеих групп животных, а для максимальных временных значений 0,50 и 0,75 ч соответственно для опыта и контроля. В опытной группе произошло уменьшение времени достижения максимальной концентрации по сравнению с контрольной. Как было показано ранее, скорость всасывания была выше у опытной группы (параметр C_{max}/AUC_{0-8}) примерно в 1,14 раза.

Средняя максимальная концентрация цефтриаксона, определяемая в плазме крови животных (C_{max}), составила для опытной группы — $115,72 \pm 10,04 \text{ мкг/мл}$ и для контроля — $120,20 \pm 14,04 \text{ мкг/мл}$. Здесь также имеются некоторые различия в величинах максимальных значений C_{max} : 143,10 — опытная группа и 155,20 мкг/мл — контроль.

Среднее значение AUC_{0-8} цефтриаксона для опытной группы составило $201,63 \pm 17,21^* \text{ мкг} \times \text{ч/мл}$ и для контроля — $239,39 \pm 30,36 \text{ мкг} \times \text{ч/мл}$. Степень относительной биологической доступности (всасывания) цефтриаксона у опытной группы по сравнению с контролем, определяемая отношением соответствующих значений AUC_{0-t} , составила 84,2%.

Среднее значение $AUC_{0-\infty}$ для цефтриаксона для опытной группы составило $204,13 \pm 17,24^* \text{ мкг/мл} \times \text{ч}$ и для контроля — $242,35 \pm 30,56 \text{ мкг} \times \text{ч/мл}$. В этом случае, степень относительной биологической доступности изучаемого препарата на основании точечных индивидуальных оценок, определяемая отношением соответствующих значений $AUC_{0-\infty}$, также составила 84,2%.

Отношение области фармакокинетической кривой от момента AUC_{0-8} до $AUC_{0-\infty}$ составило в среднем 96,01%, что говорит о достаточности времени отбора проб крови.

В целом, подводя итог, можно констатировать, что в опытной группе происходило более быстрое всасывание препарата, быстрее достигалось время максимальной концентрации цефтриаксона в плазме, но относительная биодоступность была выше в контрольной группе на фоне более высоких максимальных значений концентрации цефтриаксона.

Заключение

В проведенном экспериментальном исследовании установлено, что моделирование эффектов микрогравитации влияет на фармакокинетические параметры антибактериального препарата цефтриаксон.

В первую очередь, в условиях АНОГ происходит увеличение скорости всасывания препарата и скорости наступления максимальной концентрации. В ситуации с антибактериальным лекарственным средством это не имеет существенного терапевтического значения. Однако, если эта закономерность относится и к другим лекарственным препаратам это может оказать существенное влияние на схемы интенсивной терапии с использованием сильнодействующих лекарственных средств: наркотических обезболивающих, седативных и снотворных препаратов, препаратов влияющих на системное артериальное давление и др.

В тоже время, установлено, что максимальная концентрация цефтриаксона несколько выше в контрольной группе. В условиях АНОГ также снижается биодоступность цефтриаксона после в/м введения. Учитывая особенности фармакокинетики цефтриаксона и кратность его введения: 1—2 раза в сутки, снижение биодоступности и максимальной концентрации может привести к ослаблению антибактериального эффекта препарата. Это может потребовать коррекции схем введения или дозировки цефтриаксона.

Поскольку цефтриаксон практически не метаболизируется в организме возможным механизмом выявленного снижения максимальной концентрации препарата и его биодоступности вероятнее всего является изменения скорости экскреции. Это может быть связано с изменением почечного и печеночного кровотока.

Знание кинетики и динамики поведения фармакологического препарата позволяет рассчитать и разработать эффективные методы введения препаратов и режимы приема, усовершенствовать существующие режимы применения для индивидуальных специфических нужд, а также понять причину необычных фармакологических ответов, а значит и скорректировать их в будущем.

Список литературы

1. *Астахов Д.А., Баранов М.В., Панченков Д.Н.* и др. Морфологические аспекты влияния антиортостатической гипокинезии на течение экспериментального перитонита // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. 2012. Т. V. №2. С. 258-263.
2. *Астахов Д.А., Баранов М.В., Панченков Д.Н.* Физиологические эффекты микрогравитации как факторы риска заболеваний в космическом полете // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2012. — №2. — С. 70-76.
3. *Гончаров И.Б., Ковачевич И.В., Жернаков А.Ф.* Анализ заболеваемости в космическом полете. // Космическая биология и медицина, М. Наука, 2001, т. IV, С.145-164.
4. *Ковачевич И.В., Репенкова Л.Г., Кондратенко С.Н.* Исследование особенностей фармакологического воздействия в условиях длительного космического полета «Фарма» // Международная космическая станция. Российский сегмент. Москва, 2011, Том 1., С. 229-235.
5. *Панченков Д.Н., Баранов М.В., Астахов Д.А.* и др. Биохимические аспекты влияния антиортостатической гипокинезии на течение экспериментального перитонита // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2013, №1, С. 56-60.
6. *Синтрон Н.М., Путча Л.* Фармакокинетика в полете // Космическая биология и медицина. Совместное российско-американское издание. Человек в космическом полете. — М.: Наука, 1997. — Т. 3 — Кн. 2. — С. 469-486.
7. *Nelson B., Gardner R., Osiler D.* et al. Medical impact analysis for the space station //Aviat. Space and Environ. Med. 1990. Vol. 61, N 2.P.169-175.
8. *O'Connell S.E., Zurzola F.J.* A rapid quantitative determination of acetaminophen in plasma.// J. Pharm. Sci. 1982, Vol.71, №11, P. 1291-1294
9. *Putcha L., Cintron N.M., Vanderploeg J.M.* Pharmacokinetics of scopolamine in normal subjects placed on anti-orthostatic bedrest: (abstract) Ann. sci. meet. of the aerosp. med. Assoc. Wash. (DC). 1989.
10. *Putcha L., Pool S.L., Cintron N.M.* Pharmacology//Space Physiology and Medicine. 3rd ed. Philadelphia: Lae and Febiger. — 1994. — P. 435-446.
11. *Wegmann H.M.* Health risk and medical care considerations for the European space program // III Nihon Univ. Intern.Symp. on aerospace science Tokyo, 1990. P. 49-54.

Поступила 10.12.13

Сведения об авторах:

Баранов Михаил Викторович — к.м.н., заместитель директора по медицинским вопросам дирекции Научно-исследовательского института космической медицины ФГБУ ФНКЦ ФМБА России

Архипова Елена Николаевна — к.б.н., с.н.с. лаборатории полисистемных исследований ФГБУ «Научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии» РАМН

Лебедева Марина Андреевна — д.б.н., в.н.с. лаборатории полисистемных исследований ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАМН

Хлебникова Надежда Николаевна — к.б.н., в.н.с. лаборатории общей патологии нервной системы ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАМН

Медведева Юлия Сергеевна — м.н.с. лаборатории полисистемных исследований ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАМН

М.А. Степанова¹, Е.Н. Архипова², Ю.С. Медведева², М.Ю. Карганов², Э.Н. Эскина³

Роль изменений субфракционного состава слезной жидкости в оценке повреждающего действия мягких контактных линз и эксимерлазерной абляции роговицы при коррекции аметропий

¹ Институт усовершенствования врачей НМХЦ им. Н.И. Пирогова, 105203 Москва, ул. Нижняя Первомайская, д. 65

² ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, д.8

³ Офтальмологическая клиника «Сфера» профессора Э.Н. Эскиной, 117628 Москва ул. Старокачаловская д. 10

Методом лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) проведено исследование изменений субфракционного состава слезной жидкости (СЖ) на фоне длительного ношения мягких контактных линз (МКЛ) и при проведении эксимерлазерной коррекции аметропии методом Трансэпителиальной фоторефракционной кератэктомии (Транс ФРК). На основании анализа биологического материала, полученного у 141 пациента в возрасте от 18 до 33 лет можно сделать вывод, что длительное использование мягких контактных линз приводит к катаболическим процессам в поверхностных структурах глаза и, как следствие, к изменению качественного состава слезной жидкости. После Трансэпителиальной фоторефракционной кератэктомии происходит увеличение количества низкомолекулярных фракций и частиц среднего радиуса, что характеризует течение репаративных процессов после абляции роговицы. Исходя из результатов нашего исследования, можно сделать заключение о том, что лазерная корреляционная спектроскопия — это экспрессный анализ, с помощью которого можно диагностировать и наблюдать начальные изменения метаболизма в переднем отрезке глаза, когда объективных клинических проявлений еще нет.

Ключевые слова: лазерная корреляционная спектроскопия, слезная жидкость, трансэпителиальная фоторефракционная кератэктомия, роговица, контактные линзы

М.А. Stepanova¹, E.N. Arkhipova², Yu.S. Medvedeva², M.Yu. Karganov², E.N. Eskina³

The role of changes in the subfractional compound of tear fluid in the assessment of damaging effect from soft contact lenses and the excimer laser ablation of the cornea

N.I. Pirogov NMSC Institute for Professional development, 105203 Moscow, Nizhnyaya Pervomayskaya st., 65

² Research Institute of General pathology and pathophysiology, 125315, Moscow, Baltiyskaya st., 8

³ Ophthalmologic clinic «Sphere» by professor E.N. Eskina, 117628, Moscow, Starokachalovskaya st., 10

The method of laser correlation spectroscopy (LCS) was used for the examination of the subfractional compound of tear fluid in patients who have been using soft contact lens (SCL) for a long period and before and after the excimer laser correction with transepithelial photorefractive keratectomy (Trans PRK). Based on the analysis of biological material of 141 patients aged from 18 to 33 years old, we can conclude that prolonged usage of SCL leads to catabolic processes in surface of the anterior segment of the eye and, as a result, to changes in the qualitative composition of the tear fluid. The amount of low molecular weight fractions and medium weight ingredients increases after transepithelial photorefractive keratectomy, which can characterize reparation processes after cornea ablation. Based on the results of our study we can conclude that LCS — is express analysis, with which we can diagnose and observe the initial changes in local metabolism in the anterior segment of the eye, when the objective breaches have not seen yet.

Key words: laser correlation spectroscopy, tear fluid, contact lenses, the cornea, Trans PRK

Существующие нехирургические методы коррекции аметропии — очковая или контактная коррекция не всегда хорошо переносятся и удобны для пациентов. Помимо невозможности использовать мягкие контактные линзы существует определенный риск осложнений данного вида контактной коррекции. Не-

достатками использования МКЛ являются гипоксия, отек роговицы, повреждение эпителия, а также вероятностные осложнения: поверхностный кератит, микроцисты, эрозии, язвы роговицы, неоваскуляризация, токсико-аллергические реакции, инфекционные заболевания глаз, синдром «сухого глаза». Данные

осложнения применения МКЛ приводят к различным изменениям состава слезной жидкости [8, 11]. Методика Транс ФРК в современной модификации широко известна в мировой офтальмологической практике и зарекомендовала себя как безопасный и малотравматичный способ коррекции высоких аметропий, обеспечивающий хороший рефракционный результат, что позволяет расширить показания к применению данной методики в практике рефракционных хирургов [13]. Однако вопрос прогнозирования и интерпретации таких редких осложнений Транс ФРК, как длительная эпителизация, хейз и регресс рефракционного эффекта, остается чрезвычайно актуальным. В настоящем исследовании для решения поставленных задач был использован метод лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС), который ранее был успешно применен для оценки тяжести заболевания и эффективности лечения различных заболеваний, в том числе и глазных [1-6, 10, 12].

Методика

Пациенты, участвующие в исследованиях, находились на амбулаторном лечении и продолжают наблюдаться на базе офтальмологической клиники «Сфера». Биологический материал забирали с согласия испытуемых.

У всех обследуемых были взяты образцы слезной жидкости посредством получения смывов с глаз 0,9% раствором хлорида натрия 0,5 мл. Образцы замораживали при температуре -20°C на срок не более 5 суток, в течение которого проводился их анализ методом ЛКС.

Лазерная корреляционная спектроскопия позволяет определять субфракционный состав биоингредиентов в довольно широком диапазоне их молекулярных размеров (от 1 до 10 000 нм). Физическая сторона данного метода основана на принципах доплеровской спектроскопии [7].

Непосредственно перед измерением собранный материал размораживали и центрифугировали 15 минут 3000 об/мин для получения прозрачного супернатанта.

Субфракционный состав биологических жидкостей регистрировали, используя лазерный корреляционный спектрометр ЛКС-03-«ИНТОКС», собранный в лаборатории молекулярной и радиационной биофизики Санкт-Петербургского института ядерной физики РАН и утвержденный комитетом по новой медицинской технике МЗ РФ для определения размеров микрочастиц в биологических жидкостях (Сертификат RU.C. 39.003.A N 5381). Подробные ЛК-гистограммы, сформированные управляющей программой спектрометра, состоят из 32 точек. Количество столбцов отражает число учитываемых субфракций молекул при обработке (минимизации) спектра.

Операция проводилась на эксимерлазерной установке последнего поколения, уникальной в своем классе оборудования, SchwindAmaris® 500E с частотой импульсов 500 Гц, со специальным алгоритмом распределения «летающего пятна» и системой «Интеллектуального контроля температуры роговицы», что позволяет снизить повреждение роговицы при абляции до минимального, снизить риски осложнений и повысить эффективность рефракционного эффекта после Транс ФРК.

Проводимые исследования состояли из нескольких этапов. Всего нами было обследовано 141 чел. в возрасте от 18 до 33 лет, неотягощенных хроническими соматическими заболеваниями. Для контроля в различные этапы использовали пробы СЖ 28 чел. (56 глаз) с эметропией, без офтальмопатологии, возраст обследуемых составил от 19-26 лет. Из них 12 мужчин, 16 женщин.

Задача первого этапа исследования: оценить изменения субфракционного состава слезной жидкости под воздействием длительного ношения контактных линз. Было проведено исследование, в котором участвовали 29 пациентов (58 глаз). Отбор в группу исследования осуществлялся по следующим критериям: использование МКЛ от 1,5 года до 12 лет, миопия средней и высокой степени, отсутствие сопутствующей соматической патологии. Возраст обследуемых составил от 18 до 33 лет (средний возраст 27,6 лет). Лица данной группы не имели никакой сопутствующей офтальмопатологии, не инстиллировали препараты в конъюнктивальную полость.

Задача второго этапа исследования: влияние срока ношения контактных линз (КЛ) на изменение субфракционного состава слезной жидкости.

Отбор в группу исследования осуществлялся по следующим критериям: использование МКЛ от 1,5 года до 12 лет, миопия средней и высокой степени, отсутствие сопутствующей соматической патологии.

Пациенты были разделены на 2 подгруппы. В первую подгруппу вошли пациенты, которые используют МКЛ в качестве контактной коррекции зрения на протяжении от 1,5 до 5 лет. Во вторую подгруппу вошли пациенты, пользующиеся МКЛ в качестве контактной коррекции зрения в течение 6—12 лет. Данные пациенты также не имели никакой сопутствующей офтальмопатологии, не инстиллировали препараты в конъюнктивальную полость.

Задача третьего этапа: оценить влияние Транс ФРК на изменение состава слезной жидкости в различные сроки. Пробы СЖ отбирали на 1-й день и 3-й месяц после операции. У всех пациентов сроки эпителизации были ориентировочно одинаковыми и составляли 3—4 дня. У всех пациентов заключитель-

ного этапа исследования послеоперационный период протекал стандартно: полная эпителизация роговицы на 3 сутки, в отдаленном послеоперационном периоде каких-либо осложнений (помутнения роговицы, субэпителиальная фиброплазия) не выявлено. Группа исследования включала 26 чел. (52 глаза) с миопией средней и высокой степени, в возрасте от 20 до 30 лет. Отбор в группу исследования осуществлялся

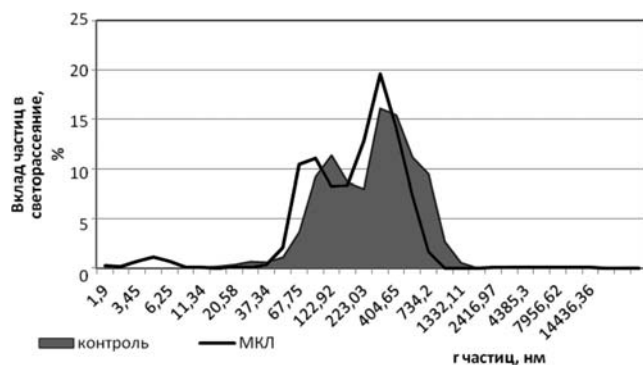


Рис. 1. Показатели слезной жидкости пациентов, использующих МКЛ, и пациентов с эмметропией. По оси абсцисс — радиус частиц (нм). По оси ординат — вклад частиц в светорассеяние (%).

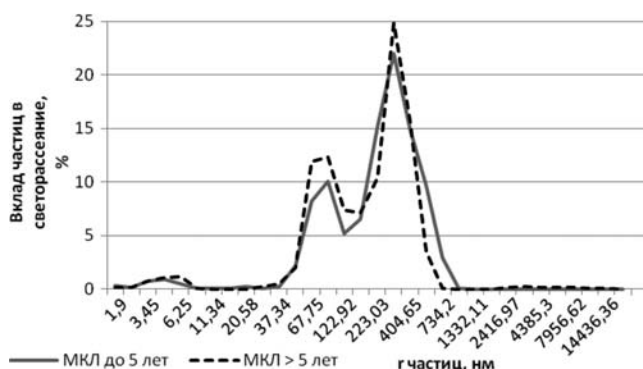


Рис. 2. Показатели слезной жидкости пациентов, использующих МКЛ на протяжении до 5 лет, показатели слезной жидкости пациентов, пользующихся МКЛ более 5 лет. По оси абсцисс — радиус частиц (нм). По оси ординат — вклад частиц в светорассеяние (%).

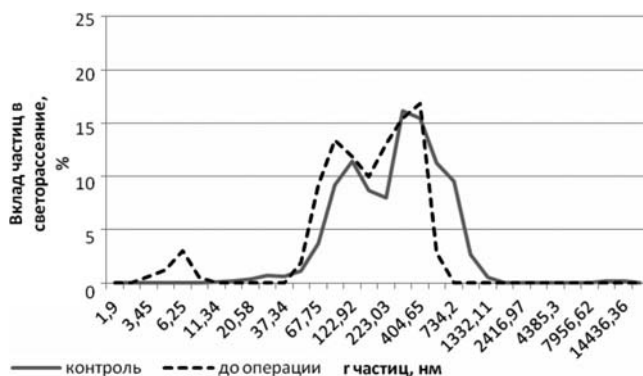


Рис. 3. Показатели СЖ пациентов до операции, использующих МКЛ, и пациентов с эмметропией. По оси абсцисс — радиус частиц (нм). По оси ординат — вклад частиц в светорассеяние (%).

по следующим критериям: использование МКЛ от 1 года ($6 \pm 1,3$ лет), проведение операции в стандартных условиях, миопия средней и высокой степени, у пациентов группы исследования проводилось взятие смывов СЖ до операции, в 1-й день и через 3 мес. после операции, КЛ были сняты не менее чем за 14 дней до операции, отсутствие сопутствующей соматической патологии.

Результаты и обсуждение

В ходе проведения первого этапа исследования было выявлено, что у пациентов, использующих МКЛ, наблюдается относительно высокий процентный вклад в светорассеяние (15—20%) среднемoleкулярных ингредиентов, к которым могут быть отнесены глико-липопротеиновые комплексы (частицы радиусом от 200 до 600 нм) (рис. 1), а также снижение процентного вклада в светорассеяние высокомолекулярных частиц радиусом от 600 до 2000 нм (крупные глико-липопротеиновые и иммунные комплексы (10%).

По результатам второго этапа проводимых исследований, нами выявлен относительно высокий процентный вклад в светорассеяние (10—13%) низкомолекулярных фракций (радиус частиц 60—200 нм, альбумины и глобулины) (рис. 2).

Кроме того, в пробах пациентов с более длительным режимом использования МКЛ наблюдается повышение процентного вклада в светорассеяние (23—25%) среднемoleкулярных ингредиентов радиусом от 200 до 600 нм (глико-липопротеины).

При оценке результатов третьего этапа нами был получен усредненный спектр СЖ пациентов контрольной группы и группы пациентов до операции. Для него характерно увеличение числа мелких частиц радиусом 90—160 нм и комплексов среднего радиуса (220—400 нм) у группы пациентов до операции (рис. 3). Спектр СЖ пациентов до операции совпадает с таковым спектром пациентов, использующих МКЛ, это обусловлено тем, что в группу обследуемых до операции вошли пациенты с длительным стажем использования МКЛ в качестве контактной коррекции имеющийся аметропии.

В ходе исследования пациентов через сутки после операции нами выявлено смещение спектра СЖ относительно такового до операции в сторону образования крупных, предположительно глико-липопротеиновых фракций радиусом 600—730 нм (рис. 4).

Общая картина спектра СЖ через 3 месяца после операции отличается от спектра, полученного до операции, а также от спектра контрольной группы. Как видно из рис. 5, в пробах СЖ пациентов в данный срок наблюдается преобладание фракций радиусом 90—200 нм.

Результаты анализа ЛК-спектров, полученных в ходе первого этапа исследований, показали, что у пациентов, использующих мягкие контактные линзы, в слезной жидкости преобладают глико-липопротеиновые комплексы и относительно повышено по сравнению с контрольной группой содержание иммунных комплексов, что позволяет предположить нарастание воспалительной интоксикации в тканях глаза, в том числе роговице, под воздействием ношения МКЛ.

Исходя из полученных данных второго этапа исследования, нами было установлено незначительное увеличение альбуминовых и глобулиновых фракций у группы пациентов, использующих мягкие контактные линзы в течение длительного срока, по сравнению с группой пациентов с менее длительным сроком использования МКЛ, что свидетельствует о тенденции к катаболическим процессам, которые могут быть вызваны повышением активности гидролаз и обусловлены хронической травматизацией поверхностных структур глаза мягкой контактной линзой и длительным стажем ее ношения. Помимо этого, в спектрах обеих групп выявлен высокий процентный вклад глико-липопротеиновых фракций, что подтверждает результаты первого этапа исследования.

В смывах СЖ у группы пациентов в 1-е сутки после операции в отличие от проб СЖ до операции незначительно увеличено количество глико-липопротеиновых фракций. Это позволило предположить тенденцию к катаболическим процессам, которые могут быть вызваны повреждающим воздействием лазера непосредственно на коллагеновые волокна роговицы, разрушенные во время абляции, мелкие фрагменты которых и дают данное преобладание в спектрах СЖ.

В сроки 3 месяца после операции было выявлено увеличение количества мелких частиц СЖ по сравнению с группой контроля, которое может быть обусловлено наличием белковых ингредиентов, таких, как альбумины, глобулины, факторы роста и цитокины белковой природы, в том числе описанный активно вырабатываемый после эксимерлазерной абляции роговицы трансформирующий ростовой фактор-β (ТРФ-бета). Присутствие данных фракций в 1-е сутки после операции и в срок 3 мес. после операции предположительно характеризуют активность репаративных процессов после абляции роговицы. Полученные данные позволяют определить характерные изменения субфракционного состава СЖ для нормального течения репаративных процессов после Транс ФРК.

Исходя из проведенных нами исследований, можно сделать вывод о том, что ношение МКЛ приводит к изменению субфракционного состава СЖ, а увеличение режима использования данного вида контак-

ной коррекции приводит к увеличению процентного вклада низкомолекулярных частиц и молекул среднего радиуса.

Трансэпителиальная фоторефракционная кератэктомия оказывает непосредственное влияние на поверхностные структуры глаза, что приводит к характерным изменениям субфракционного состава слезной жидкости. Определенные нами характерные для нормального течения послеоперационного периода Транс ФРК изменения субфракционного состава слезной жидкости, в дальнейшем могут быть использованы для мониторинга течения послеоперационного периода.

Лазерная корреляционная спектроскопия является оригинальной методикой, с помощью которой возможно на ранних сроках диагностировать начальные изменения в переднем отрезке глаза, когда объективных осложнений еще нет. Кроме этого, в дальнейшем результаты настоящего исследования могут быть использованы для скринингового мониторинга и прогнозирования течения послеоперационного процесса при поверхностных абляциях роговицы.

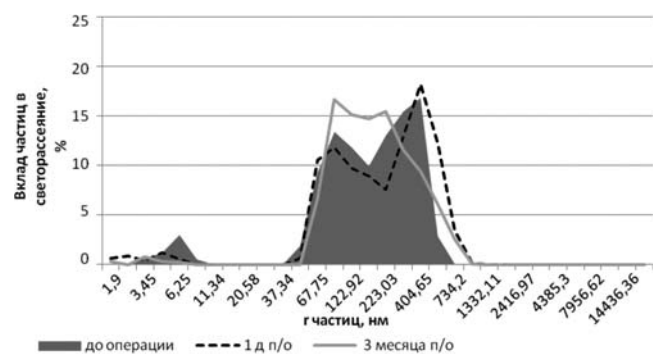


Рис. 4. Показатели СЖ пациентов группы контроля в первый день после операции и в срок 3 месяца. По оси абсцисс — радиус частиц (нм). По оси ординат — вклад частиц в светорассеяние (%).

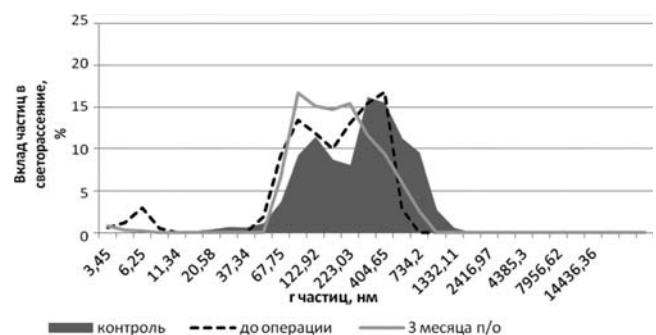


Рис. 5. Показатели СЖ пациентов группы контроля, до операции и в срок 3 месяца после операции. По оси абсцисс — радиус частиц (нм). По оси ординат — вклад частиц в светорассеяние (%).

Список литературы

1. *Архипова Е.Н., Дедаев С.И., Алчинова И.Б.* и др. Исследование взаимодействия наночастиц диоксида титана и сыворотки крови больных аутоиммунными заболеваниями // Патогенез. 2011. Т. 9. №1. С. 67-70.
2. *Карганов М.Ю., Ковалева О.И., Санадзе А.Г.* и др. Сравнительный анализ информативности радиоиммунологического исследования и лазерной корреляционной спектроскопии при миастении и миастенических синдромах // Неврологический журнал. 2003. Т. 8. №S1. С. 26-29.
3. *Ковалев И.Е., Карганов М.Ю., Румянцева Е.И., Ковалева О.И.* Лазерная корреляционная спектроскопия как эффективный метод выявления ДНК-содержащих и других макромолекулярных комплексов в сыворотке крови больных сахарным диабетом // Доклады Академии наук. 2002. Т. 386. №5. С. 693-695.
4. *Ковалева О.И., Карганов М.Ю., Ковалева Л.Г., Горбунова Н.А.* Новые возможности ранней диагностики заболеваний системы крови // Гематология и трансфузиология. 2004. Т. 49. №4. С. 7-9.
5. Лазерная корреляционная спектроскопия в медицине / Бажора Ю. И., Носкин Л. А., Изд.: Одесса. 2002, 397 с.
6. Полисистемный саногенетический мониторинг / Карганов М.Ю., Киселев М.Ф., Комаров Г.Д. и др., Москва, МИПКРО, 2001. 344 с.
7. Применение комплексного анализа слезной жидкости при контактной коррекции зрения после фото-рефракционных операций / Емелина В.Г., М. 2007, 127 с.
8. Роговично-конъюнктивальный кератоз / Брже-ский В.В., Сомов Е.Е., С.-П., 2003, С.18-22.
9. *Степанова М.А., Архипова Е.Н., Медведева Ю.С.* и др. Оценка метаболизма органа зрения в связи с длительным использованием мягких контактных линз // Материалы научной конференции «XII Всероссийская школа офтальмолога». Научная конференция. — М. — 2013, С. 395-399.
10. *Хлебникова Н.Н., Таршиц Д.Л., Карганов М.Ю.* Перспективы применения метода лазерной корреляционной спектроскопии слезной жидкости в диагностике тяжести патологического процесса при консервативных и оперативных методах лечения глазных болезней // Лазерная медицина. 1999. №3-4. С. 25-31.
11. *Эскина Э.Н., Рябенко О.И., Юшкова И.С.* и др. Оценка результатов транспителиальной фоторефракционной кератэктомии (ФРК) в коррекции миопии высокой степени (6 месяцев наблюдения) // Практическая медицина — 2012. — Т. 1, N 4(59). — С. 59-60.
12. *Karganov M., Skalny A., Alchinova I.* et al. Combined use of laser correlation spectroscopy and ICP-AES, ICP-MS determination of macro- and trace elements in human biosubstrates for intoxication risk assessment // Trace elements and electrolytes. — 2011. — Vol. 28, №2. — P. 124 — 127.
13. *Karganov M., Alchinova I., Arkhipova E., Skalny A.* Laser Correlation Spectroscopy: Nutritional, Ecological and Toxic Aspects // «Biophysics». A.N. Misra ed. — InTech, Rijeka, Croatia, 2012. — P. 1-16.

Поступила 16.12.13

Сведения об авторах:

Мария Анатольевна Степанова, клинический ординатор Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова, врач-ординатор клиники лазерной медицины «Сфера»

Елена Николаевна Архипова, к.б.н.; старший науч. сотр. лаборатории полисистемных исследований ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН

Юлия Сергеевна Медведева, мл. науч. сотр. лаборатории полисистемных исследований ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН

Михаил Юрьевич Карганов, д.б.н., профессор; заведующий лабораторией полисистемных исследований ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН

Эрика Наумовна Эскина, д.м.н., профессор, главный врач клиники лазерной медицины «Сфера»

Е.А. Смирнова, О.Л. Терехина, Д.Д. Мациевский, Т.А. Антипова, Л.П. Кобозева,
А.Б. Мичунская, О.М. Поздняков, С.В. Круглов, Л.Ю. Бахтина, Л.М. Белкина

Влияние аллоксанового диабета на функцию сердечно-сосудистой системы и перекисное окисление липидов у крыс разных генетических линий

Федеральное Государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии Российской Академии медицинских наук», 125315, Москва, ул.Балтийская, 8
Федеральное государственное бюджетное учреждение «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Ранее мы показали, что повышенная врожденная активность системы оксида азота (NO), свойственная крысам линии Август, увеличивает уязвимость к аллоксановому диабету (АлД). Цель исследования состояла в изучении влияния АлД на функцию ССС и интенсивность ПОЛ у крыс с разной активностью системы NO. У крыс Август и Вистар вызывали АлД (аллоксан 125 мг/кг, п/к, однократно) и через 3,5 мес. проводили исследования. АлД вызывал у крыс Август большее падение индекса работы сердца (на 35%), чем у крыс Вистар с АлД (на 17%). У сравниваемых крыс наблюдалось сходное падение скорости расслабления левого желудочка (на 45-49%), но не скорости сокращения. Активация ПОЛ в сердце и в печени, а также NO-системы (уровень нитратов и нитритов в плазме крови) у крыс Август были более выраженными, чем у крыс Вистар. При этом уровень hsp32 у крыс Август падал значительно в большей степени (на 93%), чем у крыс Вистар (на 61%). Патологические изменения в микроциркуляторном русле брыжейки тонкой кишки по характеру и частоте не отличались у сравниваемых крыс. Таким образом, более выраженные при АлД нарушения функции сердца у крыс Август, по сравнению с крысами Вистар, связаны с большей активацией ПОЛ и NO-системы.

Ключевые слова: диабет 1, аллоксан, функция сердца, микрососуды, ПОЛ, NO

Е.А. Smirnova, O.L. Terekhina, D.D. Matzievski, T.A. Antipova, L.P. Kobozeva,
A.B. Michunskaya, O.M. Pozdnyakov, S.V. Kruglov, L.Yu. Bakhtina, L.M. Belkina

Effect of the alloxane diabetes on the cardio-vascular system function and lipid peroxidation in rats of different genetic strains

Federal State Budgetary Institution «Institution of General Pathology and pathophysiology» of the Russian Academy of Medical Science, Russian Federation, 125315, Moscow, Baltiiskaya, 8
Federal State Budgetary Institution «Institution of Pharmacology» of the Russian Academy of Medical Science, Russian Federation, 125315, Moscow, Baltiiskaya, 8

We have previously shown that the innate increased activity of the NO- system, typical for the August rats, increases vulnerability to alloxane diabetes (ALD). The purpose of this study was to investigate the effect of ALD on the cardio-vascular system and lipid peroxidation in rats with different activity of NO-system. The August rats and Wistar rats treated with alloxan (125 mg / kg, s/c, once) were studied 3.5 months after. In August-ALD the double production significantly decreased to a greater extent (by 35%) than in Wistar-ALD (by 17%) compared with the control. As in August-ALD and in Wistar-ALD was observed the similar fall of the relaxation (-dp/dt) of the left ventricle (by 45-49%), but not the contraction rate (+dp/dt). LPO activation in the heart and liver, as well as NO-system (level of nitrates and nitrites in the blood plasma) in August rats were more pronounced than in Wistar rats. The hsp32 level in August rats fell significantly more (by 93%) than in Wistar rats (by 61%). Pathological changes in the microvasculature of the mesostenium were identical in compared rats. Thus, more pronounced cardiac dysfunction in August-ALD, compared with Wistar-ALD, associated with greater activation of lipid peroxidation and NO-system.

Key words: diabetes 1, alloxane, heart contractile function, microvessels, lipid peroxidation, nitric oxide

Сахарный диабет (СД) потенцирует развитие сердечно-сосудистой патологии, проявляющейся в виде кардиомиопатии, ишемической болезни сердца и ангиопатии. У лиц с СД часто наблюдается систолическая и диастолическая дисфункция миокарда, приводящая к развитию сердечной недостаточности [1]. Сходные данные получены на модели экспериментального СД типа 1 (СД1), вызванного у крыс стрептозотоцином (СД1-СТ) [2]. Ангиопатии, особенно выраженные при СД в микроциркуляторном русле (МЦР), в значительной степени обусловлены дисфункцией эндотелия. В развитии диабетической кардиомиопатии и ангиопатии важную роль играет окислительный стресс [3, 4, 5], который приводит к нарушению проницаемости мембран и ионного транспорта, вызывая нарушение функции кардиомиоцитов и эндотелиоцитов. Соответственно антиоксиданты ограничивают повреждение миокарда [6, 7] и сосудов [8], вызванные диабетом. Установлено, что в патогенезе СД важную роль играют не только активные формы кислорода, но и радикалы оксида азота (NO). Так при СД1-СТ нарушения функции сердца (уменьшение ударного и сердечного выброса, фракции изгнания) сопровождаются повышением активности индуцибельной и эндотелиальной NO-синтазы (iNOS) [9]. Выяснилось, что острая гипергликемия вызывает увеличение уровня iNOS, супероксидных радикалов и нитротирозина, что приводит к нарушению функции и апоптозу кардиомиоцитов [10]. Пероксинитриты, образующиеся при взаимодействии NO с супероксиданионами, напрямую оказывают токсическое действие на кардиомиоциты [11] и эндотелиоциты [12], вызывая их дисфункцию и гибель. Важная роль NO в патогенезе СД1 показана на мышцах с СД1-СТ, у которых блокада синтеза NO с помощью L-NMMA (L-N^c-monomethyl-arginin) значительно ограничивала гибель бета-клеток поджелудочной железы [13]. В дальнейшем было получено доказательство, что NO принимает прямое участие в апоптозе этих клеток [14]. Однако существующие в литературе данные о роли NO в патогенезе СД1 неоднозначны, а именно, данные как о степени активации NO-системы при СД1 [15, 9], так и об антидиабетической эффективности блокады синтеза NO противоречивы. Действительно, блокада синтеза NO, по некоторым данным, или не влияет на развитие СД1 у крыс [16, 17] или даже увеличивает тяжесть диабета [18]. Ранее мы показали, что врожденная повышенная активность системы NO, свойственная крысам линии Август [19], потенцирует развитие СД1, вызванного аллоксаном [20, 21]. Известно, что аллоксан вызывает гибель бета-клеток за счет активации в них перекисного окисления липидов (ПОЛ) [22]. Вместе с тем, неизвестно, как АД влияет на ССС и интенсивность

свободнорадикальных процессов у животных с врожденной разной активностью системы NO.

В данной работе у крыс линии Август и у крыс популяции Вистар проводили сравнительный анализ влияния длительного АД на функцию сердца, состояние МЦР, активность ПОЛ, уровень гемоксигеназы-1 (hsp32) и активность NO-системы.

Методика

Опыты проводили на крысах-самцах в возрасте 6 мес., исходная масса которых у крыс Вистар составляла $248 \pm 3,7$ г, а у крыс Август, для которых характерна меньшая масса, — $217 \pm 3,4$ г. Диабет вызывали однократным введением аллоксана (alloxan monohydrate, фирмы Sigma, Швейцария) в дозе 125 мг/кг, подкожно. Опыты проводили через 3,5 мес. после инъекции. Сопоставляли уровень гипергликемии с помощью глюкометра (Accu-Chek^R Go фирмы Roche, Германия) в капельке крови, взятой из кончика хвоста крысы, а также динамику смертности, массы животных, степень полидипсии. Степень гипертрофии левого и правого желудочков (ЛЖ и ПЖ) сердца рассчитывали по отношению их массы к массе тела крыс. Во всех сериях опытов на крысах Август и Вистар было по 2 группы животных: контроль и диабет.

Функцию ССС оценивали в условиях относительного физиологического покоя при закрытой грудной клетке под уретановым наркозом (150 мг/кг). С помощью полиэтиленового катетера (PE 10), вводимого в правую сонную артерию, регистрировали систолическое и диастолическое артериальное давление (АД), после чего катетер продвигали в полость ЛЖ и регистрировали параметры функции сердца с помощью датчика ЕМТ-746 на «Мингографе-34» (Siemens-Elema, Швеция). По кривой давления в ЛЖ рассчитывали следующие показатели: частоту сердечных сокращений (ЧСС), систолическое, диастолическое и развиваемое давление (РД), произведение ЧСС на РД (индекс работы сердца, ИРС), максимальные скорости сокращения (+dp/dt) и расслабления миокарда (-dp/dt), которые определяли по скорости подъема и падения давления в ЛЖ.

Состояние МЦР у животных оценивали, используя тотальные пленочные препараты брыжейки тонкой кишки (после фиксации 10% формалином), импрегнированных азотнокислым серебром [23]. Анализ препаратов и изготовление микрофотографий проводили с помощью светового микроскопа Aristoplan (Leitz, Германия) при увеличении 1600, оснащенного цифровой фотокамерой DCM 800 («Shangaro Tele View Optical Instruments Co», Китай). Оцифрованные изображения записывали на компьютер с помощью программы Score Photo («Microsoft», USA) и затем обрабатывали с по-

мощью программы Paint («Microsoft», USA). В каждой из четырех групп было по 5 крыс.

Активность про- и антиоксидантных систем оценивали соответственно по интенсивности ПОЛ и активности каталазы в гомогенатах ЛЖ сердца и печени. Уровень ПОЛ определяли по накоплению ТБК-активных продуктов (ТБКАП) в гомогенатах при индуцированном окислении аскорбатом (0,2 мМ) в условиях 60-минутной инкубации при 37°C. Концентрацию ТБКАП определяли спектрофотометрически по спектру поглощения в диапазоне 500-570 нм [24] в модификации [25] и выражали в единицах оптической плотности (ЕОП) на мг белка. Активность каталазы определяли путем спектрофотометрической регистрации скорости уменьшения концентрации добавленной перекиси водорода (H₂O₂) при длине волны 240 нм [26]. Активность фермента выражали в мкмоль H₂O₂, разлагаемой в минуту на 1 мг белка, используя коэффициент молярной экстинкции для H₂O₂, равный 39,4 М⁻¹ × см⁻¹.

Для характеристики свободнорадикальных процессов важно было определить содержание стресс-белка hsp32, так как окислительный стресс всегда вызывает резкую активацию синтеза этого белка [5], обладающего выраженным антиоксидант-

ным действием при различных патологиях, в том числе, и при экспериментальном диабете [8]. Содержание hsp32 определяли в печени методом Вестерн-блот анализа с использованием первых поликлональных антител (Stressgen) и вторых антител, конъюгированных с пероксидазой хрена («Jackson Immuno Research»). Визуализацию антигенной мишени осуществляли по хемилюминесценции с использованием реактивов «ECL» («Amersham») и рентгенографической пленки («Kodac»). Количественную денситометрическую обработку полученных иммуоблотов проводили путем сканирования и анализа оптической плотности блотов с помощью компьютерной программы Phosphor. Результаты представляли в виде репрезентативных диаграмм, как отношение площади сигнала в пикселях к интенсивности сигнала.

Активность системы NO изучали по суммарному содержанию в плазме крови стабильных метаболитов NO — нитратов и нитритов, отражающих уровень продукции NO в организме [27].

Результаты обрабатывали статистически с использованием t критерия Стьюдента и U-критерия Манна—Уитни. Опыты проводили с соблюдением международных норм по гуманному обращению с экспериментальными животными.

Таблица 1

Состояние крыс Вистар и Август через 3,5 мес. после введения аллоксана (M±m)

Показатели	Вистар		Август	
	Контроль (n = 12)	Диабет (n = 7)	Контроль (n = 15)	Диабет (n = 7)
Масса крыс (г)	512±21	254±11*	285±8	188±8*
Уровень глюкозы в крови (ммоль/л)	5,7±0,4	33,0±0,6*	5,8±0,2	28,0±1,9*
Потребление воды (мл/100 г массы тела в сутки)	9,3±0,85	85,3±7,8*	12,0±1,6	80,6±3,8*

Примечание. n — количество животных в каждой серии опытов. * p < 0,001 — статистически значимо при сравнении с контролями по t-критерию Стьюдента

Таблица 2

Влияние аллоксанового диабета на функцию сердечно-сосудистой системы у крыс Вистар и Август в условиях относительного физиологического покоя

Показатели	Вистар		Август	
	Контроль (n = 9)	Диабет (n = 11)	Контроль (n = 10)	Диабет (n = 12)
ЧСС (уд./мин)	361±12	307±20**	341±8,3	250±11***
АД систолическое (мм рт. ст.)	126±4,8	150±11,5*	139±7,1	134±8,9
АД диастолическое (мм рт. ст.)	79±6,2	108±10,4*	77±4,8	69±6,1^
Развиваемое давление в ЛЖ (мм рт. ст.)	137±6,6	135±10,4	141±4,6	128±5,5
Индекс работы сердца (уд./мин × мм рт. ст.)	49847±3484	41445±3518	48232±1687	31659±2492***^
Скорость сокращения (мм рт.ст /с)	5688±521	4639±382	4550±362	5125±317
Скорость расслабления (мм рт.ст /с)	3417±336	1889±119***	4125±420	2107±124***
Относительная масса ЛЖ	1,55±0,05	1,86±0,07#	2,09±0,05	2,47±0,11#
Относительная масса ПрЖ	0,83±0,04	1,17±0,07#	1,05±0,04	1,27±0,10#

Примечание. n — количество животных в каждой серии опытов. ЛЖ и ПрЖ соответственно левый и правый желудочки. # p < 0,05 — статистически значимо при сравнении с контролями по U-критерию Манна—Уитни; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 — при сравнении с контролями, ^ p < 0,05 — между группами с диабетом по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Состояние крыс Вистар и Август с АлД (Вистар-АлД и Август-АлД) представлено в табл. 1.

Через 3—4 дня после введения аллоксана у сравниваемых крыс содержание глюкозы в крови увеличилось примерно одинаково по сравнению с контролем (в 5—5,8 раза). Максимальная смертность наблюдалась через 3—10 дней после инъекции аллоксана, которая у Август-АлД составляла 36%, а у Вистар-АлД — 20%, общая смертность в течение 3,5 мес. составляла соответственно 48% и 37%. Крысы в обеих группах не прибавляли в весе или немного худели по сравнению с исходной массой. Степень полидипсии была сходной в сравниваемых группах.

Из табл. 2 видно, что диабет вызывал падение ЧСС в обеих группах, у Вистар-АлД ЧСС уменьшалась на 54 уд./мин, а у Август-АлД еще в большей степени — на 91 уд./мин.

АД как систолическое, так и диастолическое у Вистар-АлД было существенно увеличено по сравнению с контролем, а у Август-АлД эти показатели не изменялись. У тех и других крыс наблюдалось небольшое уменьшение РД (на 10—11%) в ЛЖ, в то время как падение ИРС у Вистар-АлД составляло 17%, а у Август-АлД — 35%. Эта более выраженная депрессия функции сердца у Август-АлД, по сравнению с Вистар-АлД, связана в основном с большей брадикардией. Следует отметить, что падение ЧСС у Август-АлД не компенсируется увеличением РД, что обычно наблюдается в норме. В целом, эти факты свидетельствуют в пользу большего угнетения функции сердца у Август-АлД. У сравниваемых крыс с диабетом наблюдалось резкое падение скорости расслабления ЛЖ (на 45—49%), но не скорости сокращения. Отсутствие изменений в систолической функции миокарда, но не в диастолической обнаружено и на модели СД1-СТ [28]. Дисфункция диабетического миокарда как у человека, так и у животных в значительной степени связана с нарушением транспорта Ca^{2+} [29, 30]. У крыс с СД1-СТ дефекты в механизме расслабления связаны с нарушением Ca^{2+} -транспортирующей функции саркоплазматического ретикулама (СПР) кардиомиоцитов и уменьшением уровня Ca^{2+} -АТФазы-2а в СПР, что приводит к нарушению механизма обратного захвата Ca^{2+} [28]. Нарушение транспорта Ca^{2+} в кардиомиоцитах у крыс с СД1-СТ обнаружено и в других работах [31]. Есть основание полагать, что при АлД диабете уменьшение скорости расслабления связано с нарушением тех же механизмов. Следует отметить, что на данной модели диабета у сравниваемых крыс не было сердечной недостаточности, признаком которой является повышение конечно-диастолического давления в ЛЖ (выше 12 мм рт.ст.). У крыс же с АлД этот показатель составлял 3—3,5 мм рт.ст. (в контроле около 0 мм рт.ст.).

Диабет стимулировал у тех и других крыс ремоделирование сердца, выражавшееся в гипертрофии обоих желудочков. Как видно из той же таблицы, гипертрофия ЛЖ была сходной (18% и 21%) у сравниваемых крыс, в то время как гипертрофия ПрЖ желудочка у Вистар-АлД была значительно больше, чем у Август-АлД (соответственно 41% и 20%, $p < 0,01$). Это явление описано у крыс с СД1-СТ, у которых в ЛЖ обнаружены фиброзис и увеличение содержания коллагена, с чем и связывают гипертрофию ЛЖ [2]. Важно отметить, что у Август-АлД гипертрофия обоих желудочков развивается раньше, чем у Вистар-АлД: так, через 1 месяц после введения аллоксана у первых гипертрофия ЛЖ и ПрЖ составляла соответственно 22% ($p < 0,001$) и 24% ($p < 0,001$), в то время как у Вистар-АлД в этот период небольшая гипертрофия сформировалась только в ЛЖ (10%, $p < 0,05$ по критерию U). Следовательно, в более поздние сроки диабета у крыс Август сохраняется такая же гипертрофия, в то время как у крыс Вистар указанные изменения продолжают нарастать. Степень ремоделирования миокарда отражает как увеличение нагрузки, так и повреждение миокарда. У Вистар-АлД гипертрофия ЛЖ в значительной степени может быть связана с повышенным АД, а в ПрЖ — с повышенным давлением в легочной артерии. Однако, как было отмечено, у Август-АлД не происходит увеличения АД, то есть гипертрофия у этих крыс не связана с увеличенной нагрузкой, что говорит о значительной патологической составляющей ремоделирования сердца. Нарушение механизма расслабления миокарда и наличие гипертрофии сердца в обеих группах диабетиков свидетельствует о развитии выраженной кардиомиопатии, которая может быть связана с некротической и апоптотической гибелью кардиомиоцитов [32], что ведет к потере сократительного миокарда и замещению его коллагеном и очагами фиброзиса [2].

Анализ нарушений структуры МЦР, которое при диабете подвергается дисфункции в большей степени, чем макрососуды, показал, что Август-АлД не отличались от Вистар-АлД по характеру и частоте повреждений (рис. 1 на 3-й странице обложки). У тех и других крыс были обнаружены локальные спазмы артериол, дилатация венул, микроаневризмы (рис. 1Б) и повышенная извитость микрососудов. Часто встречаются тромбирование капилляров (рис. 1В), разрывы микрососудов и многочисленные кровоизлияния (рис. 1Г).

Внутрисосудистые изменения характеризуются образованием эритроцитарных агрегатов по типу «монетных столбиков» или более плотных образований, характерных для сладж-синдрома. Внесосудистые изменения представлены выходом эритроцитов, клеточными инфильтратами и периваскулярным отеком. Описанные тяжелые нарушения в структуре и функции МЦР свидетельствуют о выключении большой

части микрососудов из кровообращения, что приводит к тяжелым нарушениям обменных процессов в окружающих тканях. Есть основание полагать, что наблюдавшиеся повреждения микрососудов, гипертрофия и дисфункция миокарда, вызванные АлД, в значительной степени обусловлены активацией ПОЛ и NO-системы, которые показаны ниже.

АлД вызывал в сердце у крыс Август, в отличие от крыс Вистар, значительную активацию ПОЛ (рис.2А.), которая выражалась в увеличении исходного уровня ТБКАП в миокарде на 66%. При этом чувствительность к окислению не отличалась от контроля, хотя по абсолютной величине у крыс Август-АлД уровень ТБКАП во время инкубации всегда был значительно выше контроля. Степень активации каталазы при АлД была сходной у крыс Вистар и Август и составляла соответственно 37% и 48%. В печени резкая активация ПОЛ под влиянием диабета наблюдалась в обеих сравниваемых группах (рис. 2Б.). Это явление выражалось как в падении уровня ТБКАП, так и в чувствительности к окислению. У Август-АлД, по сравнению с Вистар-АлД, наблюдается более резкое снижение уровня ТБКАП в печени, а, следовательно, и более выраженная активация ПОЛ.

При этом активность каталазы у Август-Д падает в большей степени, чем у Вистар-АлД — соответственно на 28% и 10% по сравнению с контролем. Феномен падения уровня ТБКАП при АлД, по нашему мнению, связан с чрезмерной активацией ПОЛ, которая привела к истощению субстрата окисления — жирнокислотных остатков фосфолипидов мембран. Падение чувствительности к окислению, особенно выраженное у крыс Август-АлД, также свидетельствует об истощении мембранных липидов и о большем повреждении клеточных мембран у этих крыс. Важно отметить, что значительное увеличение уровня ТБКАП как в сердце, так и в печени ранее наблюдали только через 3 дня после введения аллоксана [21]. Очевидно, что падение содержания ТБКАП, так же как и увеличение этого показателя по сравнению с контрольным уровнем, отражает степень активации ПОЛ.

Диабет вызывал у сравниваемых крыс резкое падение содержания hsp32, но у Август-АлД значительно большее, чем у Вистар-АлД (рис. 3).

Возможно, это различие является одной из причин более выраженной активации ПОЛ у первых, по сравнению с вторыми. Важно отметить, что в острый период АлД (через 2 недели) у тех и других крыс мы наблюдали не падение, а наоборот, резкое увеличение (в 4 раза) уровня hsp32. Эти факты свидетельствуют об истощении антиоксидантной защиты при хроническом АлД.

Таким образом, при диабете у крыс Август более выраженные нарушения функции сердца, чем у крыс Вистар, сопровождаются и более значительной акти-

вацией ПОЛ и падением антиоксидантной активности. Это явление, с большой долей вероятности, может быть связано с более выраженной активацией системы NO у Август-АлД, которая, как было показано ранее, наблюдается в острый период АлД [21]. При хроническом диабете наблюдается та же закономерность. На рис. 4 видно, что в контроле исходный уровень нитратов и нитритов в сравниваемых группах сходный, но у Август-АлД уровень метаболитов увеличивается на 98%, а у Вистар-АлД на 61%.

Таким образом, и при длительно существующем АлД более выраженная активация ПОЛ у крыс Август, по сравнению с крысами Вистар, сопровождается увеличенной активацией системы NO. Установлено, что увеличение уровня NO-радикалов приводит к образованию пероксинитритов, которые, являясь мощными окислителями

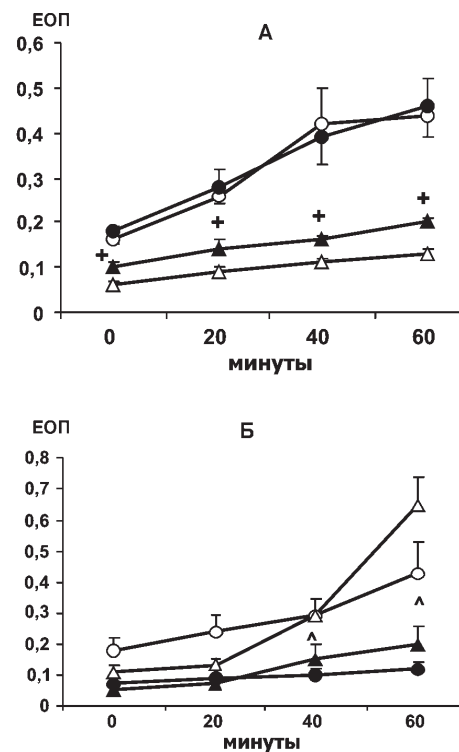


Рис. 2. Влияние аллоксанового диабета на накопление ТБКАП в гомогенатах миокарда (А) и печени (Б) у крыс Вистар и Август при индуцированном окислении в условиях 60-минутной инкубации. По оси ординат — уровень ТБКАП в относительных оптических единицах (ЕОП). По оси абсцисс — время инкубации в минутах. Белые и черные кружки — соответственно контроль и диабет в группах крыс Вистар, белые и черные треугольники — контроль и диабет у крыс Август. На рис. 1А — + — статистически значимые отличия диабета от контроля у крыс Август — $p < 0,001$; статистически значимые отличия между диабетиками Вистар и Август во всех точках инкубации: от $p < 0,02$ до $p < 0,01$ по t критерию Стьюдента. На рис. 1Б — статистически значимые отличия диабета от контроля у крыс Август во всех точках составляют от $p < 0,05$ до $p < 0,01$, а у крыс Вистар — от $p < 0,01$ до $p < 0,003$ по t критерию Стьюдента; ^ — статистически значимые отличия между группами с диабетом — $p < 0,05$ по U критерию Манна-Уитни.

индуцируют процессы ПОЛ в мембранах [33], вызывают одонитевые разрывы в ДНК [34] и нитрование белков [35]. Одним из механизмов активации NO-синтазы при диабете опосредуется ядерным фактором транскрипции NF- κ B (nuclear transcription factor κ B) [36]. На мышцах было показано, что уровень NF- κ B в поджелудочной железе возрастает уже через 30 мин после инъекции аллоксана [37]. Кислородные радикалы, в избытке образующиеся при гипергликемии, активируют этот фактор [37], который, как показано, может напрямую активиро-

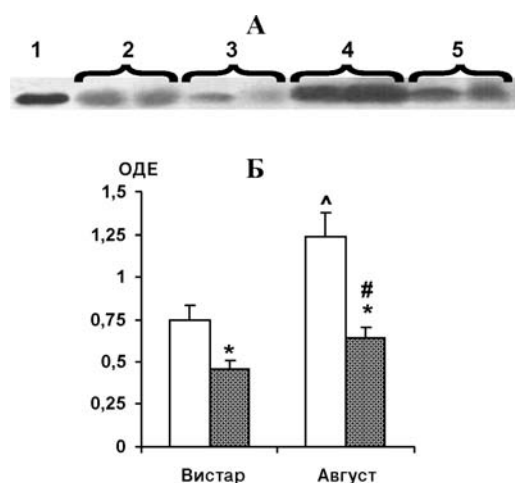


Рис. 3. Влияние аллоксанового диабета на уровень гемоксигеназы-1 (hsp32) в печени у крыс Август и Вистар при аллоксановом диабете. А — репрезентативные иммуноблоты hsp32: 1 — маркер hsp32, 2, 3 — крысы Вистар — соответственно контроль и диабет; 4, 5 — крысы Август в том же порядке.

Б — где по оси ординат — уровень hsp32 в относительных денситометрических единицах (ОДЕ). Белые столбики — контроль, заштрихованные — диабет. Статистически значимые отличия: всюду $p < 0,05$ по U-критерию Манна—Уитни — ^ — между контролями, # — между диабетиками и контролями, * — между диабетиками.

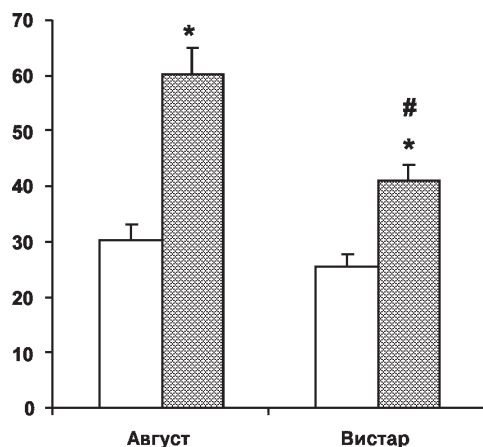


Рис. 4. Влияние аллоксанового диабета на уровень нитратов и нитритов в плазме крови у крыс Август и Вистар с аллоксановым диабетом. Белые столбики — контроль, заштрихованные — диабет.

По оси ординат — уровень метаболитов в мМ. * — статистически значимое отличие диабета от контроля — $p < 0,001$ по t-критерию Стьюдента, # — между диабетиками — $p < 0,002$ по t-критерию Стьюдента.

вать iNOS [36], что и приводит к гиперпродукции NO. Вместе взятые эти факты дают основание считать, что вызванная диабетом более резкая активация ПОЛ у крыс Август связана с большей активацией NO-системы. О важной роли NO в активации ПОЛ свидетельствует ранее установленный факт [21], что блокада гиперпродукции NO с помощью L-NNA в острый период АД нормализует интенсивность ПОЛ, уровень iNOS и 3-нитротирозина (маркера уровня пероксинитритов).

В целом, представленные данные дают основание считать, что более выраженные нарушения функции сердца при АД у крыс Август, по сравнению с крысами Вистар, связаны с большей активацией ПОЛ и NO-системы.

Список литературы

1. Fein F.S., Sonnenblick E.H. Diabetic cardiomyopathy // Prog Cardiovasc Dis. — 1985. — V.27, №4. — P.255-270.
2. Loganathan R., Bilgen M., Al-Hafez B., Smirnova I.V. Characterization of alterations in diabetic myocardial tissue using high resolution MRI // Int J Cardiovasc Imaging. — 2006. — V.22, №1. — P. 81-90.
3. Fiordaliso F., Bianchi R., Staszewsky L. et al. Antioxidant treatment attenuates hyperglycemia-induced cardiomyocyte death in rats // J Mol Cell Cardiol. — 2004. — V.37, №5. — P. 959-968.
4. Wold L.E., Ren J. Streptozotocin directly impairs cardiac contractile function in isolated ventricular myocytes via a p38 map kinase-dependent oxidative stress mechanism // Biochem Biophys Res Commun. — 2004. — V.318, №4. — P. 1066-1071.
5. Abraham N.G., Kappas A. Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system // Free Radic Biol Med. — 2005. — V.39, №1. — P. 1-25.
6. Muruganandan S., Gupta S., Kataria M. et al. Mangiferin protects the streptozotocin-induced oxidative damage to cardiac and renal tissues in rats // Toxicology. — 2002. — V.176, №3. — P.165-173.
7. Shen X., Zheng S., Metreveli N.S., Epstein P.N. Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy // Diabetes. — 2006. — V.55, №3. — P. 798-805.
8. Kruger A.L., Peterson S.J., Schwartzman M.L. et al. Up-regulation of heme oxygenase provides vascular protection in an animal model of diabetes through its antioxidant and antiapoptotic effects // J Pharmacol Exp Ther. — 2006. — V.319, №3. — P. 1144-1152.
9. Crespo M.J., Zalacain J., Dunbar D.C. et al. Cardiac oxidative stress is elevated at the onset of dilated cardiomyopathy in streptozotocin-diabetic rats // J. Cardiovasc. Pharmacol. Therap. — 2008. — V.13, №1. — P. 64-71.
10. Ceriello A., Quagliaro L., D'Amico M. et al. Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat // Diabetes. — 2002. — V.51, №4. — P. 1076-1082.
11. Kohr M.J., Roof S.R., Zweier J.L., Ziolo M.T. Modulation of myocardial contraction by peroxynitrite // Front Physiol. — 2012. — V.3. — Article 468.
12. Kruger A.L., Peterson S., Turkseven S. et al. D-4F Induces heme oxygenase-1 and extracellular superoxide dismutase, decreases endothelial cell sloughing, and improves vascular reactivity in rat model of diabetes // Circulation. — 2005. — V.111, №23. — P. 3126-34.
13. Lukic M.L., Stosic-Grujicic S., Ostojic N. и др. Inhibition of nitric oxide generation affects the induction of diabetes by streptozocin in mice // Biochem Biophys Res Commun. — 1991. — V.178, №3. — P. 913-920.

14. **McDaniel M.L., Corbett J.A., Kwon G., Hill J.R.** A role for nitric oxide and other inflammatory mediators in cytokine-induced pancreatic beta-cell dysfunction and destruction // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 1997. — V.426. — P. 313-319.
15. **Cellek S., Anderson P.N., Foxwell N.A.** Nitroergic neurodegeneration in cerebral arteries of streptozotocin-induced diabetic rats: a new insight into diabetic stroke // http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Cellek%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=15616031 *Diabetes.* — 2005. — V.54. — P. 212-219.
16. **Haluzik M., Nedvidkova J., Skrha J.** The influence of methylene blue and L-name on the development of streptozotocin-induced diabetes in rats // *Sb Lek.* — 1999. — V.100, №3. — P. 213-217.
17. **Vasilijevic A., Buzadzic B., Korac A.** Beneficial effects of L-arginine nitric oxide-producing pathway in rats treated with alloxan // *J Physiol.* — 2007. — V.584(Pt 3). — P. 921-933.
18. **Maree A., Peer G., Iaina A.** et al. Nitric oxide in streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats // *Clin. Sci. (Lond).* — 1996. — V.90, №5. — P.379-384.
19. **Микоян В.Д., Кубрина Л.Н., Манухина Е.Б.** и др. Различие в стимуляции синтеза NO при тепловом шоке у крыс генетически различных популяций // *Бюлл. эксп. биол. и мед.* — 1996. — Т. 121, №6. — С. 634-637.
20. **Белкина Л.М., Смирнова Е.А., Терехина О.Л.** и др. Роль оксида азота в патогенезе ишемии миокарда и сахарного диабета типа 1 у крыс разных генетических линий // *Патогенез.* — 2012. — Т. 10, №2. — С. 44-58.
21. **Белкина Л.М., Терехина О.Л., Антипова Т.А.** и др. Влияние блокады синтеза NO на свободно-радикальные процессы при остром аллоксановом диабете у крыс разных генетических линий // *Рос. Физиол. Ж. им. И.М. Сеченова.* — 2013. — Т. 99, №11. — С. 1273-1281.
22. **Lenzen S.** The Mechanisms Of Alloxan- And Streptozotocin-Induced Diabetes // *Diabetologia.* — 2008. — V.51. — P. 216-226.
23. **Куприянов В.В., Караганов Я.Л., Козлов В.И.** Микроциркуляторное русло. — М.: Медицина, 1975.
24. **Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // *Analyt. Biochem.* — 1979. — V. 95. — P. 351-358.
25. **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.- V.202.- P. 249—255.
26. **Luck H.** Catalase / Bergmeyer H.U. (ed): *Methods of enzymatic analysis* // New York, Verlag-Chemie Academic Press. — 1963. — P. 885 — 888.
27. **Benjamin N., Vallance P.** Plasma nitrite as a marker of nitric oxide production // *Lancet.* -1994. — V.344, №8927.- P. 960.
28. **Lacombe V.A., Viatchenko-Karpinski S., Terentyev D.** et al. Mechanisms of impaired calcium handling underlying subclinical diastolic dysfunction in diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007 Nov;293(5):R1787-97.
29. **Pierce G.N., Russell J.C.** Regulation of intracellular Ca²⁺ in the heart during diabetes // *Cardiovasc Res.* - 1997. — V.34, №1. — P. 41-47.
30. **Sridhar A., Emami S., Bonagura J.D.** et al. Mechanisms of impaired calcium handling underlying subclinical diastolic dysfunction in diabetes // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* — 2007. — V.293, №5. — P. 1787-1797.
31. **Shao C.H., Rozanski G.J., Patel K.P., Bidasee K.R.** Dyssynchronous (non-uniform) Ca²⁺ release in myocytes from streptozotocin-induced diabetic rats // *J Mol Cell Cardiol.* - 2007.- V.42, №1.- P.234-246.
32. **Frustaci A., Kajstura J., Chimenti C.** et al. Myocardial cell death in human diabetes // *Circ. Res.* — 2000. — V.87, №12. — P. 1123-1132.
33. **Radi R., Beckman J.S., Bush K.M., Freeman B.A.** Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide // *Arch Biochem Biophys.* — 1991. — V.288, №2. — P. 481-487.
34. **Salgo M.G., Bermudez E., Squadrito G.L., Pryor W.A.** Peroxynitrite causes DNA damage and oxidation of thiols in rat thymocytes [corrected] // *Arch Biochem Biophys.* — 1995. — V.322, №2. — P. 500-505.
35. **Peluffo G., Radi R.** Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology // *Cardiovasc. Res.* — 2007. — V.75. — P. 291-302.
36. **Siebenlist U., Franzoso G., Brown K.** Structure, regulation and function of NF-kappa B // *Annu. Rev. Immunol.* — 1994. — V.10. — P. 405-455.
37. **Ho E., Chen G., Bray T.M.** supplementation of n-acetylcysteine inhibits nfkappab activation and protects against alloxan-induced diabetes in cd-1 mice // *FASEB J.* — 1999. — v.13. — p.1845-1854.

Поступила 23.12.13

Сведения об авторах:

Смирнова Елена Александровна — к.б.н., с.н.с. лаб. регуляторных механизмов стресса и адаптации ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН»

Терехина Ольга Леонидовна — н.с. лаб. регуляторных механизмов стресса и адаптации ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН»

Мацневский Дмитрий Дмитриевич — к.т.н., зав. лаб.

Антипова Татьяна Алексеевна — к.б.н., зав. лаб. нейрофармакологии, ФГБУ «НИИ Фармакологии» РАМН

Кобозева Людмила Петровна — к.б.н., в.н.с. лаб. патоморфологии, ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН

Мичунская Александра Борисовна — к.б.н., в.н.с. лаб. патоморфологии, ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН

Поздняков Олег Михайлович — д.м.н., профессор, член-корр РАМН, зав. лаб. патоморфологии, ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН

Круглов Сергей Васильевич — к.б.н., с.н.с. лаб. регуляторных механизмов стресса и адаптации ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН

Бахтина Лидия Юрьевна — к.б.н., в.н.с. лаб. регуляторных механизмов стресса и адаптации ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН

Белкина Людмила Михайловна — д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаб. регуляторных механизмов стресса и адаптации, ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН

Н.Н. Васильева, И.Г. Брындына, С.В. Протасова, Е.Г. Бутолин

Сурфактантная система легких при аллоксановом диабете у крыс с различной устойчивостью к стрессу

ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России, 426034, г.Ижевск, ул. Коммунаров, 281

При экспериментальном сахарном диабете наблюдается понижение поверхностно-активных свойств легких на фоне повышения содержания лизофосфолипидов легочного сурфактанта. Изменения сурфактантной системы легких коррелируют с уровнем глюкозы, гликозилированного гемоглобина и 11-ОКС в крови. Полученные результаты свидетельствуют о том, что степень нарушений в системе легочного сурфактанта при аллоксановом диабете зависит от устойчивости или предрасположенности животных к стрессу.

Ключевые слова: легочный сурфактант, аллоксановый диабет, индивидуальная стресс-устойчивость

N.N. Vasiljeva, I.G. Bryndina, S.V. Protasova, E.G. Butolin

Surfactant system of lung in rats with different resistance to stress under alloxan diabetes

Izhevsk State Medical Academy, 281, Kommunarov str., Izhevsk, 426034

It is shown that the surface active properties of lung under experimental diabetes mellitus was decreased on the background of increased LPL content in alveolar space. Surfactant changes correlated with the level of glucose, glycosylated hemoglobin and 11-oxycorticosteroids in blood. The obtained results indicate that the degree of impairment in the pulmonary surfactant system in alloxan diabetes depends on the resistance or susceptibility of animals to stress.

Key words: pulmonary surfactant, alloxan diabetes, individual stress resistance.

Аллоксановый диабет у лабораторных животных является моделью инсулинзависимого сахарного диабета, в патогенезе которого ключевую роль играет прогрессирующая гибель β -клеток поджелудочной железы [9]. В системе дыхания, как одном из важных компонентов жизнеобеспечения, происходят изменения при отклонении гомеостатических показателей, вызываемых нарушениями метаболизма при сахарном диабете, в том числе и в легочном сурфактанте, обеспечивающем респираторные и нереспираторные функции [12]. Реализация цитотоксического потенциала аллоксанового диабета опосредуется активацией процессов образования свободных радикалов [6], инициирующих перекисное окисление липидов. Состав фосфолипидов легочного сурфактанта, обеспечивающий поверхностно-активные свойства легких, подвергается в этих условиях модификации, что приводит к нарушению его функций. Сахарный диабет многими авторами рассматривается как метаболический (окислительный) стресс [2].

Нейровегетативные реакции на стресс и их метаболическое обеспечение имеют ряд особенностей в зависимости от индивидуальной реактивности особей к стрессу. На основании поведения животных, представляющего собой комплексный ответ, можно

прогнозировать их индивидуальную стресс-устойчивость [4].

В работе изучено формирование диабет-индуцированных изменений функциональных свойств и состава фосфолипидов легочного сурфактанта у животных в зависимости от прогностической устойчивости к эмоциональному стрессу.

Методика

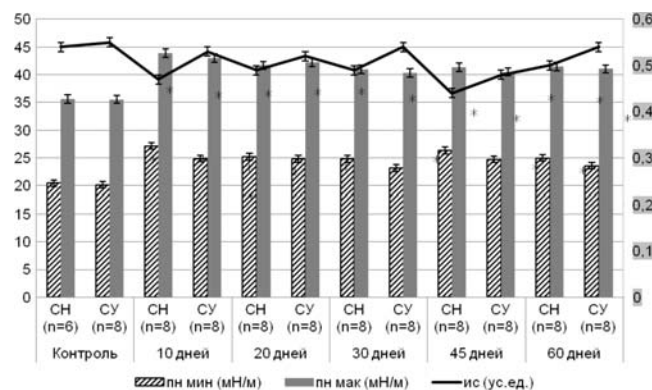
Моделирование сахарного диабета было проведено на 77 половозрелых беспородных крысах-самцах массой 180-220 г однократным введением аллоксана тетрагидрата (мезоксалилмочевина, «Fluka Chemika», Швеция) в дозе 170 мг/кг массы тела подкожно [8]. Содержание, уход за животными и выведение из эксперимента осуществляли в соответствии с «Правилами, рекомендованными Физиологической секцией Российского национального комитета по биологической этике». В динамике развития сахарного диабета измеряли объем выпитой воды, диурез, массу тела, учитывали количество погибших крыс, а также определяли уровень глюкозы глюкозооксидазным методом (наборы «Витал Диагностикс», Россия) и гликозилированного гемоглобина (GHb) в крови при помощи наборов «Био-Ла-Тест» («Erba Lachema», Чехия). На основании предварительного тестирова-

ния животных по поведению в «открытом поле» выделяли группы активных (прогностически устойчивых — СУ) и неактивных (прогностически неустойчивых — СН) крыс [5]. Состояние легочного сурфактанта оценивали по показателям поверхностной активности бронхо-альвеолярных смывов: минимальному и максимальному поверхностному натяжению (ПН), рассчитанному на их основе индексу стабильности по J. Clements [11], содержанию общих фосфолипидов [3] и их фракций [10]. Экстракцию фосфолипидов осуществляли после центрифугирования бронхо-альвеолярных смывов смесью Блора для определения общих фосфолипидов или реактивом Фолча для определения их фракций. Фракционирование индивидуальных классов фосфолипидов производили методом восходящей хроматографии в тонком слое силикагеля (пластины «Сорбфил», Россия) с дальнейшим денситометрическим анализом проб (денситометр «Сорбфил», Россия). Показатели сурфактантной системы легких исследовали на 10, 20, 30, 45 и 60 дни эксперимента. Оценивали степень развития стрессорных изменений по концентрации 11-оксикортикостероидов (11-ОКС) флюориметрическим методом. Достоверность различий между группами крыс выявляли с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни, данные представляли как среднее значение ± ошибка средней. Для выявления корреляционной зависимости был использован ранговый тест Спирмена. Различия выборок считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения SPSS 11.5 for Windows.

Результаты и обсуждение

После введения диабетогенной дозы аллоксана у животных в обеих экспериментальных группах наблюдалась гипергликемия (табл. 1).

В динамике развития сахарного диабета отмечалось снижение поверхностно-активных свойств легких на всех сроках эксперимента (рисунок). Так, на 10-й и 20-й день в обеих группах животных возраста-



Показатели поверхностной активности сурфактанта в бронхо-альвеолярных смывах

ли показатели ПН, при этом у активных особей на этих сроках были зафиксированы максимальные значения уровня глюкозы и гликозилированного гемоглобина. К 30-му дню у активных крыс цифры ПН достоверно не отличались от контрольных величин.

На 45-й день было зафиксировано наименьшее значение индекса стабильности в обеих группах, составившее 78% ($p < 0,01$) и 86% ($p < 0,05$) от контрольного уровня соответственно у стресс-неустойчивых и стресс-устойчивых особей на фоне повышения цифр ПН и увеличения содержания глюкозы в крови у предрасположенных крыс на 52% ($p < 0,001$). На 60-й день показатели ПН оставались увеличенными в обеих группах, но при этом нормализовался индекс стабильности, а также уровень гликозилированного гемоглобина. Динамика изменений содержания 11-ОКС в крови у активных животных проявлялась в виде максимального повышения (более чем в 2 раза) на ранних сроках эксперимента с постепенным снижением к 60-му дню. У пассивных крыс после пика значения данного показателя на 10-й день развития диабета в последующем отмечалось его снижение к 30-му и 45-му дню.

Значительную роль в нарушении поверхностно-активных свойств сурфактанта играют изменения

Содержание глюкозы, гликозилированного гемоглобина и 11-ОКС в крови

Таблица 1

Показатели	Контроль		Аллоксан 10 дней		Аллоксан 20 дней		Аллоксан 30 дней		Аллоксан 45 дней		Аллоксан 60 дней	
	СН n = 8)	СУ n = 8)	СН n = 6)	СУ n = 6)	СН n = 6)	СУ n = 7)	СН n = 6)	СУ n = 6)	СН n = 6)	СУ n = 6)	СН n = 6)	СУ n = 6)
Глюкоза, ммоль/л	5,93 ± 0,99	5,65 ± 0,18	9,38 ± 0,46*	9,84 ± 0,36*	8,28 ± 0,08*	8,44 ± 0,17*	7,6 ± 0,17*	7,58 ± 0,21*	9,17 ± 0,11*#	8,11 ± 0,23*	7,55 ± 0,08*#	7,8 ± 0,07*
ГНб, мкмоль фру/г Нб	5,53 ± 0,13	5,90 ± 0,28	7,47 ± 0,36*	8,54 ± 0,26*	8,3 ± 0,21*#	7,33 ± 0,37*	7,15 ± 0,37*	7,3 ± 0,43*	7,73 ± 0,12*	8,36 ± 0,35*	6,15 ± 0,44	6,22 ± 0,33
11-ОКС, мкг/л	102,7 ± 2,66	99,1 ± 5,48	209,2 ± 10,61*#	266,3 ± 2,4*	106,56 ± 3,39	113,9 ± 3,9*	69,3 ± 2,96*#	129,2 ± 4,9*	51,4 ± 0,8*#	107,5 ± 10,8	99,5 ± 8,05	82,9 ± 4,02*

Примечание.* — статистически значимые отличия от контроля; # — статистически значимые отличия между группами

Фракции фосфолипидов легочного сурфактанта

Показатели (мкмоль/г)	Контроль		Аллоксан 10 дней		Аллоксан 20 дней		Аллоксан 30 дней		Аллоксан 45 дней		Аллоксан 60 дней	
	СН n = 8)	СУ n = 8)	СН n = 6)	СУ n = 6)	СН n = 6)	СУ n = 7)	СН n = 6)	СУ n = 6)	СН n = 6)	СУ n = 6)	СН n = 6)	СУ n = 6)
Общие фосфолипиды	37,14 ± 4,56	38,37 ± 3,49)	42,80 ± 6,24	52,95 ± 5,16*	40,50 ± 1,71#	70,38 ± 6,26*	73,14 ± 4,68*#	46,83 ± 4,74	37,78 ± 6,95	37,61 ± 3,81	40,06 ± 5,33)	37,83 ± 0,7
Фосфатидилхолин	18,74 ± 2,19	19,44 ± 1,67	7,3 ± 1,22*#	11,82 ± 1,5)*	9,61 ± 0,54*#	19,56 ± 1,71	18,81 ± 1,41	14,96 ± 1,71	5,89 ± 0,1*	8,34 ± 1,0*	10,9 ± 1,52*	13,3 ± 0,07*
Лизофосфатидилхолин	0,37 ± 0,04	0,38 ± 0,03	11,07 ± 1,43*	12,06 ± 1,24*	11,82 ± 0,56*#	17,02 ± 1,7*	16,43 ± 1,1*#	9,34 ± 1,15*	13,5 ± 2,54*	9,23 ± 0,96*	8,58 ± 1,08*#	5,94 ± 0,36*
Сфингомиелин	5,58 ± 0,6	5,7 ± 0,47	10,18 ± 1,18*	12,24 ± 1,24*	6,96 ± 0,28#	11,49 ± 1,28*	15,75 ± 1,1*#	7,05 ± 0,65	10,21 ± 1,9*	7,48 ± 0,74*	7,64 ± 0,1)#	5,27 ± 0,3
Фосфатидилэтанолламин	4,12 ± 0,55	4,24 ± 0,44	11,03 ± 2,16*	12,62 ± 0,83*	5,89 ± 0,37*#	9,39 ± 0,89*	13,84 ± 1*#	7,37 ± 0,65*	5,05 ± 1,1	6,05 ± 0,71*	6,55 ± 0,86*	6,16 ± 0,17*

Примечание. * — статистически значимые отличия от контроля; # — статистически значимые отличия между группами

спектра фосфолипидов (табл. 2). Уровень фосфатидилхолина, обеспечивающего в большей степени поверхностную активность сурфактанта, снижался в обеих исследуемых группах на 10-й, 45-й, 60-й дни и не имел достоверных отличий от контрольных значений к 30-му дню. Содержание лизофосфатидилхолина в динамике эксперимента превышало в несколько раз значения контрольных величин, что при аллоксановом диабете является результатом деацилирования фосфатидилхолинов на фоне активирования фосфолипазы А₂. Низкий уровень фосфатидилхолина и высокое содержание его лизоформ, обладающих мембранодеструктивным действием, способствуют дестабилизации функций легочного сурфактанта [7]. Наблюдаемое на всех сроках эксперимента изменение количества фосфатидилэтанолламина и фосфатидилхолина, вероятно, является результатом их взаимопревращения.

Корреляционная модель взаимосвязей у активных животных существенно отличалась от таковой в группе пассивных особей. Так, на 10-й день уровень общих фосфолипидов у стресс-устойчивых крыс имел положительную связь ($r = 0,98$, $p < 0,01$) с содержанием 11-ОКС в крови, в то время как у неустойчивых животных такой зависимости выявлено не было. Аналогичные закономерности были выявлены у стресс-устойчивых крыс в наших предыдущих работах по изучению влияния хронического иммобилизационного стресса на показатели сурфактантной системы легких [1]. Также в этой группе существовала прямая связь ($r = 0,94$, $p < 0,01$) между количеством фосфолипидов и индексом стабильности, являющегося показателем функциональной активности сурфактанта. На 20-й день в группе пассивных животных было установлено, что содержание гликозилированного гемоглобина, которое имело на данном сроке максимальное значение за все время наблюдения, от-

рицательно связано с уровнем фосфолипидов ($r = -0,98$, $p < 0,001$). У активных особей отмечалась положительная связь между уровнем глюкозы, гликозилированного гемоглобина и 11-ОКС, с одной стороны, и показателями поверхностного натяжения, с другой стороны. Если на протяжении 45 дней наблюдения в обеих группах животных между уровнем 11-ОКС и глюкозой в крови отмечалась положительная корреляционная зависимость, то к 60-му дню содержание 11-ОКС у неактивных крыс имело отрицательную связь ($r = -0,71$, $p < 0,01$) с уровнем глюкозы, а в группе активных — и с уровнем гликозилированного гемоглобина, что, возможно, связано с преобладанием влияния других контринсулярных гормонов.

Таким образом, аллоксановый диабет у крыс приводит к снижению поверхностно-активных свойств альвеолярного выстилающего комплекса и существенным изменениям фосфолипидного спектра легочного сурфактанта с увеличением доли сфингомиелина и лизофосфатидилхолина. Степень связанных с диабетом изменений сурфактантной системы легких коррелирует с уровнем глюкозы в крови, 11-ОКС и гликозилированного гемоглобина. Большая выраженность изменений изучаемых показателей наблюдается у стресс-неустойчивых животных.

Список литературы

1. Брындина И.Г., Данилов Г.Е., Васильева Н.Н. и др. Стресс и легкие / Патогенез. — 2007. — Т 5, №1-2. — С. 42-48.
2. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты. — М., 2001. — 256 с.
3. Комаров Ф.И., Коровкин Б.Ф., Меньшиков В.В. Биохимические исследования в клинике. — Л., Медицина, 1981. — 407 с.

4. **Коплик Е.В., Салиева Р.М., Горбунова А.В.** Тест открытого поля как прогностический критерий устойчивости к эмоциональному стрессу у крыс линии Вистар / Журн. высш. нерв. деят. — 1995. — Т. 45, вып. 4. — С. 775-780.

5. **Коплик Е.В.** Метод определения критерия устойчивости крыс к эмоциональному стрессу / Вестн. нов. мед. технол. — 2002. — Т. 9, №1. — С. 16-18.

6. **Ланкин В.З., Корчин В.И., Коновалова Г.Г.** и др. Роль антиоксидантных ферментов и антиоксиданта пробукола в антирадикальной защите β -клеток поджелудочной железы при аллоксановом диабете / Бюл. экспериментал. биологии и медицины. — 2004. — Т. 137, №1. — С. 27-31.

7. **Мотавкин П.А., Гельцер Б.И.** Клиническая и экспериментальная патофизиология легких — М., Наука, 1998. — 366 с.

8. **Пальчикова Н.А., Селятицкая В.Г., Шорин Ю.П.** Количественная оценка чувствительности экспериментальных животных к диабетогенному действию аллокса-

на / Проблемы эндокринологии. — 1987. — №4. — С. 65-68.

9. **Пальчикова Н.А., Кузьминова О.И., Селятицкая В.Г.** Влияние перфторана на чувствительность животных к диабетогенному действию аллоксана и течение экспериментального диабета / Бюллетень СО РАМН. — 2006. — №3 (121). — С. 113-116.

10. **Покровский Е.А., Каргаполов А.В.** Модификация метода тонкослойной хроматографии фосфолипидов / Лаб. дело. — 1970. — №6. — С. 337-341.

11. **Clements J.A.** Surface tension of lung extracts / — 1957. — V. 95, N 1. — P. 170-172.

12. **Mendelson C.R.** Endocrinology of the Lung: Development and Surfactant Synthesis. — Medical, 2000. — 344 p.

Поступила 06.15.13

Сведения об авторах:

Васильева Наталья Николаевна — канд. мед. наук, доцент кафедры нормальной физиологии

Брындина Ирина Георгиевна — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой патофизиологии

Протасова Светлана Владимировна — канд. биол. наук, ассистент кафедры биохимии

Бутолин Евгений Германович — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой биохимии

Е.В. Пруткина, А.В. Сепп, Н.Н. Цыбиков

Ферменты азурофильных гранул нейтрофилов и матриксная металлопротеиназа-2 как маркеры стадий развития экспериментального респираторного дистресс-синдрома

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации 672090, Чита, ул. Горького, 39-А

На нелинейных крысах-самцах воспроизводили острый респираторный дистресс-синдром по оригинальной методике. Животным путем пункции трахеи вводили лизат 45-55 тыс. крысиных нейтрофилов в 0,2 мл 0,9% раствора хлорида натрия (способ защищен патентом РФ). В каждую стадию развития синдрома методом ИФА определяли концентрации нейтрофильной эластазы, миелопероксидазы и матриксной металлопротеиназы-2 в плазме крови и бронхоальвеолярной лаважной жидкости. Показано, что маркером развития экссудативной стадии является увеличение концентраций нейтрофильной эластазы и миелопероксидазы в плазме крови и лаважной жидкости. О пролиферативной стадии свидетельствует высокий уровень матриксной металлопротеиназы-2 при неизменном содержании эластазы и миелопероксидазы в исследованных жидкостях. Уменьшение концентрации матриксной металлопротеиназы-2 в обеих биологических жидкостях сопутствует развитию фибротической фазы дистресс-синдрома.

Ключевые слова: стадии экспериментального дистресс-синдрома, эластаза, миелопероксидаза, матриксная металлопротеиназа-2

E.V. Prutkina, A.V. Sepp, N.N. Tsybikov

Enzymes of azurophilic neutrophil granules and matrix metalloproteinase-2 as markers of the developmental stages of experimental respiratory distress syndrome

Chita State Medical Academy, 39-A, Gor'kogo str., Chita, 672090

Acute Respiratory Distress Syndrome was reproduced in the non-linear male rats by the original method. The animals were injected lysate 45-55 thousand rat neutrophils in 0,2 ml 0,9% sodium chloride solution by puncture of the trachea (method patented RF). At each stage of syndrome development concentration of neutrophil elastase, myeloperoxidase and matrix metalloproteinase-2 in serum and bronchoalveolar lavage fluid was determined by ELISA. The increase of the concentration of neutrophil elastase and myeloperoxidase in plasma and lavage fluid has been shown to be a marker of exudative stage. Proliferative phase is marked by high levels of matrix metalloproteinase-2 at a constant content of elastase and myeloperoxidase in both liquids. Reduction of matrix metalloproteinase-2 concentration in both biological fluids is accompanied by the development of fibrotic phase distress syndrome.

Key words: stages of experimental distress syndrome, elastase, myeloperoxidase, matrix metalloproteinase-2

В настоящее время острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) остается одной из основных проблем медицины, являясь, как и рак легких, наиболее частой причиной смерти в пульмонологии [6, 7]. С 90-х годов XX века выделяют раннюю, трудно диагностируемую обратимую стадию ОРДС — острое повреждение легких (ОПЛ) [2, 5, 7]. Диагноз ОПЛ/ОРДС устанавливают на основании ряда данных: факторов риска, шкалы J. Mugaу (учитывает рентгенографию легких, степень гипоксемии, растяжимость легочной ткани и необходимость особых режимов ИВЛ), отсутствия левопредсердной гипертензии [5-7, 11]. Фазу ОПЛ в

большинстве случаев выделяют, опираясь на индекс артериальной гипоксемии, который является неспецифичным, так как зависит от многих, в том числе внелегочных, причин [1, 3]. Ряд исследователей предлагает диагностировать ОПЛ при помощи оценки содержания внесосудистой воды в легких методом транспульмональной термодилуции [5], который является технически сложным и малодоступным. Кроме того, оценка тяжести и прогноз возможны при уже развившемся ОПЛ, чувствительных и специфичных предикторов развития этого состояния и перехода его в последующую фазу — ОРДС не существует [3, 7, 8].

По данным морфологических исследований легких людей, умерших в результате тяжелой травмы, признаки интерстициального и альвеолярного отека регистрируются уже через 2-3 часа от воздействия повреждающего агента. При этом в сосудах микроциркуляторного русла легких, межальвеолярных перегородках возрастает содержание нейтрофилов и макрофагов, ведущих к их повреждению [7, 8]. В свою очередь, именно с адгезией к эндотелию связан феномен гиперактивации сегментоядерных лейкоцитов, при котором происходит нерегулируемое высвобождение микробцидных соединений не в фагосому, а в экстраклеточное пространство. В этот момент мобилизуются как кислородзависимые бактерицидные системы нейтрофила, так и агрессивные медиаторы азурофильных гранул (эластаза, миелопероксидаза (МРО) и др.) [2]. В свою очередь, эластаза способна активировать семейство матриксных металлопротеиназ (ММП), которые выделяются лейкоцитами, фибробластами в интерстиций в неактивной форме [10, 12] с последующим формированием местного «протеазного взрыва», повреждающего альвеолярно-капиллярную мембрану. В связи с вышесказанным, возникло предположение: уровень аутоагрессивных ферментов нейтрофилов может служить предиктором развития ОПЛ, а их динамика — критерием смены стадий, проверка.

Методика

Объектом исследования служили половозрелые нелинейные лабораторные крысы-самцы. Эксперименты проводились с соблюдением Международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985), одобрены локальным этическим комитетом. ОПЛ/ОРДС моделировался следующим образом. Под местной анестезией 0,25% раствором новокаина проводили пункцию трахеи между 3-4 кольцами с одновременным однократным введением лизата 45-55 тыс. крысиных нейтрофилов в 0,15-0,20 мл физиологического раствора. Попадание лизата в бронхиальное дерево контролировали аускультативно: оно косвенно подтверждалось кратковременным замедлением сердцебиения до 180-200 в минуту (при исходном 260-290) и кратковременным апноэ в момент введения.

Для приготовления лизата клетки выделяли из крови животных на ступенчатом градиенте плотности фиколл-верографина: 1,13/1,12/1,06 г/мл. Чистота фракции нейтрофилов составляла 92-94%. Выделенные нейтрофильные гранулоциты разделяли на аликваты по 50 ± 5 тыс. клеток в 0,15-0,20 мл физиологического раствора и путем замораживания-оттаивания из них получали лизаты [9]. Контрольной группе

($n = 12$) эндотрахеально вводили эквивалентные объемы физиологического раствора.

Животных выводили из эксперимента путем передозировки кетамина на 1, 3 и 6 сутки (по $n = 15$ на каждые). Пробу крови получали пункцией яремной вены, лаваж легких выполняли стерильным 0,9% раствором хлорида натрия. Развитие ОПЛ/ОРДС во всех случаях удостоверяли морфологически, для чего осуществляли забор легких, фиксировали их в нейтральном 10% растворе формалина и заливали в парафин, гистологические срезы окрашивали гематоксилин-эозином и пикрофуксином. Содержание ферментов нейтрофилов в плазме крови и бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) оценивали методом твердофазного ИФА с использованием видоспецифических коммерческих тест-систем фирмы «Antibodies online» (Germany).

Статистическая обработка проводилась с использованием пакета программ BIOSTAT. При сравнении групп использовался критерий Краскела-Уоллиса, попарно группы сопоставлялись по критерию Манна-Уитни, различия считали значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного (25-й и 75-й перцентили) интервала — указан в скобках.

Результаты и обсуждение

В первые сутки эксперимента определялась острая (экссудативная) стадия развития синдрома, морфологический эквивалент непосредственно ОПЛ [7], которая характеризовалась проявлениями «острого неинфекционного диффузного десквамативно-макрофагального альвеолита», с накоплением в просвете альвеол мононуклеарных клеток, нейтрофилов и других клеточных элементов, десквамированных альвеолоцитов, отечной жидкости. В просвете сосудов отмечались множественные нейтрофильно-лейкоцитарные стазы, причем не только в капиллярах межальвеолярных перегородок, но и в венах и венулах. Наблюдался выход и накопление эритроцитов в просвете альвеол (рисунок на 3-й странице обложки).

Макроскопически такие легкие были отечны — выполняли практически все свободное пространство грудной клетки, после ее вскрытия не спадались, имели плотнoэластическую консистенцию, темно-красный цвет, с поверхности разрезов стекала отечная жидкость.

В эту стадию развития процесса в плазме крови резко возрастала концентрация всех изучаемых ферментов, но самым значительным был прирост эластазы — почти в 50 раз ($p = 0,000$) (табл. 1).

В БАЛЖ наблюдалась схожая динамика: увеличивалось количество всех энзимов, при этом рост содержания эластазы был пропорционален увеличению

ММР-2 — в два раза по сравнению с контрольными значениями ($p = 0,002$ и $p = 0,016$ соответственно) (табл. 2).

На 3 сутки эксперимента в легких микроскопически отмечалось разрешение от отека, регистрировались признаки миграции мононуклеарных клеток и пролиферации фибробластов, а также синтеза коллагена, что является характерным для пролиферативной фазы ОРДС [7]. В эту стадию развития процесса в плазме крови содержание эластазы резко — более чем в 10 раз — уменьшалось, возвращаясь к уровню контрольной группы ($p = 0,21$). Концентрация МРО также снижалась до величин, отмечающихся у здоровых животных ($p = 0,20$). Содержание ММР-2, напротив, оставалось высоким: почти в полтора раза выше, чем у здоровых животных ($p = 0,003$), не отличаясь от уровня предыдущей фазы ОПЛ/ОРДС ($p = 0,97$) (табл. 1). В лаважной жидкости отмечалась аналогичная динамика концентраций изучаемых веществ: количество эластазы и миелопероксидазы

уменьшалось до величин контрольной группы ($p = 0,09$ и $p = 0,30$ соответственно), а ММР-2 было по-прежнему высоким, как и в первые сутки эксперимента ($p = 0,009$ при сопоставлении с контролем и $p = 0,65$ по сравнению с 1 сутками) (табл. 2).

На 6 сутки от момента введения лизата в легких животных отмечались морфологические маркеры фибротической фазы ОРДС: увеличение объема соединительной ткани в интерстиции; изменения в интима артериол в виде гипертрофии мышечного слоя, иногда вплоть до их полной облитерации; появление гиалиновых мембран [7]. В эту фазу и в плазме крови, и БАЛЖ содержание всех изучаемых ферментов было на уровне контрольной группы (табл. 1, 2).

Общепринятым является деление этиологических факторов ОПЛ/ОРДС на две группы: с прямым повреждающим воздействием на легкие (пневмонии, аспирация жидкостей, ингаляция токсикантов и др.) и не оказывающих прямого воздействия на орган (шоки, сепсис и др.). Разработанный нами способ в бо-

Таблица 1
Концентрация ферментов нейтрофилов в плазме крови на этапах развития экспериментального ОПЛ/ОРДС (Ме (25-й; 75-й))

Фермент	Контроль (n = 12)	1 сутки (n = 15)	3 сутки (n = 15)	6 сутки (n = 15)
Эластаза (нг/мл)	0 (0; 6,0)	45,1 (13,3; 55,8) $p = 0,000^*$	4,2 (0; 19,5) $p = 0,21$ $p_1 = 0,017^*$	0 (0; 6,5) $p = 0,79$ $p_1 = 0,001^*$ $p_2 = 0,30$
ММР-2 (нг/мл)	158,7 (139; 164)	208,6 (191,3; 223,5) $p = 0,001^*$	192,4 (189; 225,2) $p = 0,003^*$ $p_1 = 0,97$	146,3 (130,6; 163,1) $p = 0,19$ $p_1 = 0,000^*$ $p_2 = 0,000^*$
МРО (нг/мл)	68,6 (60,6; 70,4)	92,0 (83,3; 101,5) $p = 0,000^*$	71,2 (66,5; 76,3) $p = 0,20$ $p_1 = 0,003^*$	69,2 (66,5; 73,6) $p = 0,51$ $p_1 = 0,003^*$ $p_2 = 1,0$

Примечание. p — значение различий по сравнению с контрольной группой; p_1 — значение различий по сравнению с 1 сутками эксперимента; p_2 — значение различий по сравнению с 3 сутками эксперимента; * — значимые различия.

Таблица 2
Концентрация ферментов нейтрофилов в БАЛЖ на этапах развития экспериментального ОПЛ/ОРДС — Ме (25-й; 75-й)

Фермент	Контроль (n = 12)	1 сут. (n = 15)	3 сут. (n = 15)	6 сут. (n = 15)
Эластаза (нг/мл)	18,5 (4,2; 33,4)	45,4 (38,5; 54,6) $p = 0,002^*$	26,1 (20; 38,5) $p = 0,09$ $p_1 = 0,024^*$	22,5 (8,9; 36,7) $p = 0,41$ $p_1 = 0,014^*$ $p_2 = 0,76$
ММР-2 (нг/мл)	3,2 (1,1; 5,7)	7,0 (6,2; 7,9) $p = 0,016^*$	7,6 (6,8; 9,9) $p = 0,009^*$ $p_1 = 0,65$	1,9 (0,3; 2,1) $p = 0,18$ $p_1 = 0,000^*$ $p_2 = 0,000^*$
МРО (нг/мл)	74,7 (67,7; 85,4)	90,6 (85,3; 98,5) $p = 0,008^*$	83,8 (80,9; 86,8) $p = 0,30$ $p_1 = 0,03^*$	82,3 (80,6; 87,9) $p = 0,50$ $p_1 = 0,02^*$ $p_2 = 1,0$

Примечание. p — значение различий по сравнению с контрольной группой; p_1 — значение различий по сравнению с 1 сутками эксперимента; p_2 — значение различий по сравнению с 3 сутками эксперимента; * — значимые различия.

льшей степени моделирует ОПЛ/ОРДС вследствие прямого воздействия. Возможность воспроизведения синдрома путем введения концентрата медиаторов нейтрофилов, коим является лизат, доказывает их ведущую роль в повреждении альвеолярно-капиллярной мембраны (основного звена патогенеза ОПЛ/ОРДС). Несмотря на наличие определенных особенностей у каждого из этиологических факторов, обязательным триггером синдрома является воздействие системного воспалительного ответа с неконтролируемым распространением в крови провоспалительных цитокинов [2, 7, 8]. Последние вызывают примиривание циркулирующих нейтрофильных гранулоцитов к последующим стимулам, а нейтрофил-опосредованную цитотоксичность считают причиной полиорганных повреждений. Легочная микроциркуляция уникальна: здесь сосредоточен главный пул маргинальных нейтрофилов, и их эмиграция происходит преимущественно из капилляров, поэтому полиморфноядерные лейкоциты являются «виновниками» повреждения легких и в случае развития ОПЛ/ОРДС без непосредственного воздействия на орган.

Адгезия нейтрофилов, респираторный взрыв и секреция азурофильных гранул представляют собой функциональную триаду, объединенную общим механизмом [2], в связи с чем именно в фазу ОПЛ концентрации эластазы и МРО в плазме крови, а также в БАЛЖ были наибольшими.

Высокий уровень ММР-2 и в экссудативную, и в последующую пролиферативную стадию развития процесса, на наш взгляд, объясним следующими фактами. Местоположением ММР-2 (или нейтрофильной желатиназы) в сегментоядерном лейкоците одни исследователи считают азурофильные гранулы, другие — С-частицы, есть мнение, что энзим локализуется в обеих органеллах [2, 4, 13]. Такое расположение металлопротеиназы ведет к росту ее концентрации в первую стадию синдрома, внося свой вклад в повреждение легких, так как основным субстратом фермента является коллаген базальных мембран. Установлено, что ММР-2 также экспрессируется фибробластами в период активной регенерации ткани [10], которая наблюдается в пролиферативную стадию развития ОРДС, поэтому его уровень эту фазу остается высоким. Есть данные, что ММР-2 активирует трансформирующий фактор роста β (TGF β), высвобождая его из матрикса, кроме того, инактивирует важнейший провоспалительный цитокин IL-1 β [12]. В связи с этим ММР-2 нельзя однозначно отнести к повреждающим ферментам, так как она способна оказывать значимые протективные эффекты: препятствовать адгезии нейтрофилов к эндотелию и их гиперактивации (нивелируются свойства IL-1 β), а также опосредованно привлекать в очаг моноциты

крови (TGF β является их хемоаттрактантом). Уменьшение количества ММР-2, обнаруженное нами в фибротическую стадию синдрома, вероятно, является одним из механизмов нарушения регенерации поврежденных структур.

Выводы

Маркерами развития экссудативной стадии экспериментального ОРДС (собственно ОПЛ) являются увеличение концентраций нейтрофильной эластазы и МРО в плазме крови и БАЛЖ.

О пролиферативной фазе синдрома свидетельствует высокий уровень ММР-2 при неизменном содержании эластазы и МРО в плазме крови и БАЛЖ.

Уменьшение концентрации ММР-2 в обеих биологических жидкостях сопутствует развитию фибротической фазы ОРДС.

Список литературы

1. *Власенко А.В., Мороз В.В., Яковлев В.Н.* и др. Сложности в диагностике острого респираторного дистресс-синдрома // Материалы XII Съезда федерации анестезиологов-реаниматологов России. — Москва, 2010. — С. 92-93.
2. *Галкин А.А., Демидова В.С.* Роль адгезии в активации нейтрофилов в цитотоксическом взаимодействии нейтрофилов с эндотелием // Успехи современной биологии. — 2011. — Т. 131, №1. — С. 62-78.
3. *Григорьев Е.В., Разумов А.С.* Перспективы диагностики синдрома острого повреждения легких // Медицина неотложных состояний. — 2008. — №6 (19). — С. 23-32.
4. *Мальцева В.Н., Сафронова В.Г.* Неоднозначность роли нейтрофила в генезе опухоли // Цитология. — 2009. — Т. 51, №6. — С. 467-474.
5. *Мороз В.В., Голубев А.М.* Классификация острого респираторного дистресс-синдрома // Общая реаниматология. — 2007. — Т. III, №5-6. — С. 7-9.
6. *Мороз В.В., Власенко А.В., Голубев А.М.* и др. Дифференцированное лечение острого респираторного дистресс-синдрома, обусловленного прямыми и непрямыми этиологическими факторами // Общая реаниматология. — 2011. — Т. VII, №4. — С. 5-15.
7. Острый респираторный дистресс-синдром / под ред. Б.Р. Гельфанда, В.Л. Кассиля. — М.: Литера, 2007. — 232 с.
8. *Павлов К.А., Дубова Е.А., Мишнев О.Д., Щеголев А.И.* Медиаторные взаимодействия при остром респираторном дистресс-синдроме // Общая реаниматология. — 2007. — Т. III, №5-6. — С. 208-212.
9. *Цыбиков Н.Н., Пруткина Е.В., Сепп А.В., Исакова Н.В.* Способ моделирования острого повреждения легких // Заявка на изобретение РФ №2010130728/14. — 2012. — Бул. №3. Решение о выдаче патента от 31.01.2012.
10. *Шойхет Я.Н., Кореновский Ю.В., Мотин Ю.Г.* и др. Роль матриксных металлопротеиназ при воспалительных заболеваниях легких // Проблемы клинической медицины. — 2008. — №3 (15). — С. 99-101.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

11. Future research directions in acute lung injury (summary of a National Heart, Lung and Blood Institute Working Group) // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2003. — Vol. 167 (2). — P. 1027-1035.

12. **Hiller O.** Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3 and membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of

fibrinogen and factor XII // *J. Biol. Chem.* — 2000. — Vol. 275. — P. 8-13.

13. **Warren L.L., Downey G.P.** Leukocyte Elastase. Physiological Functions and Role in Acute Lung Injury // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2001. — Vol. 164. — P. 896-904.

Поступила 237.04.12

Сведения об авторах:

Пруткина Елена Владимировна — к.м.н., доцент кафедры патологической физиологии ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития РФ

Сепп Андрей Валентинович — ассистент кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития РФ

Цыбиков Намжил Нанзатович — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития РФ

Ж.Б. Дашинамжилов¹, Ц.Д. Туртуев²

Фармакотерапевтическая эффективность экстракта сухого «Сэ-год-5» при повреждении печени четыреххлористым углеродом у белых крыс

¹ Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, 670047, г. Улан-Удэ, Сахьяновой, 6

² Автономное учреждение здравоохранения Республиканская клиническая больница восстановительного лечения Центр восточной медицины, 670000, г. Улан-Удэ, Ленхобоева, 10

Установлено, что комплексное растительное средство «Сэ-год-5» обладает выраженным гепатопротекторным действием при повреждении печени CCl_4 у белых крыс. Базисным механизмом гепатопротекторного действия «Сэ-год-5» является способность его ингибировать процессы перекисного окисления липидов и стимулировать антиоксидантную систему организма.

Ключевые слова: острый токсический гепатит, «Сэ-год-5»

Zh.B. Dashinamzhilov¹, C.D. Turtuev²

Pharmacotherapeutical efficiency of the dry extract «Ce-god-5» in liver injury induced by CCl_4 in white rats

It has been established that the complex plant remedy «Ce-god-5» possesses the marked hepatoprotective effect in liver injury induced by CCl_4 in white rats. The ability to inhibit the processes of lipid peroxidation and stimulate antioxidant system of the body is a basic mechanism of hepatoprotective activity of «Ce-god-5».

Key words: Acute toxic hepatitis, «Ce-god-5»

Конец XX столетия ознаменовался прогрессирующим интересом к гепатологии, что связано с широким распространением острых и хронических заболеваний печени.

В клинической практике в качестве средств патогенетической терапии хронических гепатитов применялись самые разнообразные препараты, многие из которых оказались неэффективными и вышли из употребления. В частности, отмечается их низкая терапевтическая активность при вирусных гепатитах. Кроме того, многие из них часто вызывают побочные эффекты в виде аллергии, гипертермии, усиления цитолитического и холестатического синдромов. Необходимо отметить и тот факт, что большинство применяемых в клинической практике гепатопротекторов являются дорогостоящими, поскольку выпускаются зарубежом, а следовательно, малодоступны для широких слоев населения нашей страны [2].

Подобная ситуация диктует необходимость внедрения новых эффективных отечественных средств гепатопротекторного действия для лечения хронического гепатита, особенно растительных средств в силу их доступности и хорошей переносимости.

Цель исследования — изучить влияние многокомпонентного фитоэкстракта «Сэ-год-5» в состав, которого входят: плоды шиповника майского (*Rosa majalis*

Hemm L.) и кориандра посевного (*Coriandrum sativum* L.), цветы календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.), корни девясила высокого (*Inula helenium* L.) и одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg. s. l.) на функциональное состояние печени при повреждении печени четыреххлористым углеродом.

Методика

Экспериментальная работа выполнена на белых крысах Вистар обоего пола с исходной массой 160—200 г. Животные находились в стандартных условиях содержания в виварии Института общей и экспериментальной биологии СО РАН на обычном рационе (Приказ МЗ СССР №1179 от 10.10.83 г.). Эксперименты осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР №755 от 12.08.77 г.). Эвтаназию животных осуществляли методом мгновенной декапитации под легким эфирным наркозом.

Острый токсический гепатит воспроизводили путем подкожного введения 50% масляного раствора четыреххлористого углерода (CCl_4) в объеме 0,4 мл/100 г массы животных 1 раз в день в течение 4 дней [1]. Животным опытной группы интрагастрально вводили водный раствор экстракта сухого (ЭС) «Сэ-год-5» в те-

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

чение 21 дней в дозе 50,0 мг/кг массы тела 1 раз в день за 30 мин до приема пищи. Животным контрольной группы внутривенно вводили по аналогичной схеме дистиллированную воду.

Для оценки гепатопротекторной активности ЭС «Сэ-год-5» определяли биохимические показатели, характеризующие функциональное состояние печени лабораторных животных: активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), содержание общего билирубина и щелочной фосфатазы (ЩФ) в сыворотке крови [4]; Экскре-

торно-поглотительную функцию печени оценивали по скорости выведения бромсульфалеина с желчью [6]. Антипирин вводили крысам внутривенно в дозе 50 мг/кг, определение антипирина в сыворотке крови проводили через 1, 2, 3 и 4 ч с расчетом периода его полувыведения по формуле:

$$T_{1/2} = 0,693 / K,$$

где:

K — константа скорости, вычисляемая как тангенс угла наклона прямой, построенной в координатах ln (антипирин в плазме) — (время).

Таблица 1

Влияние «Сэ-год-5» на биохимические показатели сыворотки крови белых крыс при повреждении печени тетрахлорметаном

Показатели	Группы животных		
	Интактная	Контрольная (CCl ₄)	Опытная (CCl ₄ + "Сэ-год-5")
7 сутки			
АЛТ, мкМ	1,7 ± 0,10	2,5 ± 0,20*	1,7 ± 0,10**
АСТ, мкМ	1,3 ± 0,03	1,8 ± 0,09*	1,3 ± 0,06**
ЩФ, ед. Бод.	14,0 ± 1,28	25,0 ± 1,20*	17,0 ± 1,50**
Билирубин общ., мг%	5,0 ± 1,45	14,8 ± 1,10*	11,5 ± 1,60**
14 сутки			
АЛТ, мкМ	0,6 ± 0,11	4,2 ± 0,15*	2,9 ± 0,20**
АСТ, мкМ	0,4 ± 0,05	2,8 ± 0,11*	1,4 ± 0,12**
ЩФ, ед. Бод.	14,0 ± 1,00	28,0 ± 2,0*	17,0 ± 2,11**
Билирубин общ., мг%	0,5 ± 0,03	4,8 ± 1,00*	2,0 ± 0,10**
21 сутки			
АЛТ, мкМ	0,6 ± 0,11	3,3 ± 0,12*	1,9 ± 0,10**
АСТ, мкМ	0,4 ± 0,05	1,8 ± 0,04*	1,0 ± 0,13**
ЩФ, ед. Бод.	13,0 ± 1,5	22,6 ± 2,4*	14,0 ± 2,0**
Билирубин общ., мг%	0,5 ± 0,03	1,9 ± 0,09*	1,0 ± 0,05**

Примечание. Здесь и далее: * — различия достоверны по отношению к интактному контролю при P ≤ 0,05; ** — различия достоверны по отношению к контролю при P ≤ 0,05

Таблица 2

Влияние «Сэ-год-5» на антиоксидативную функцию печени крыс при остром токсическом гепатите (7-е сутки)

Группы животных	Период полувыведения антипирина, %	Период полувыведения БСФ, %
Интактная	100	100
Контрольная (CCl ₄)	128	145
Опытная I (CCl ₄ + "Сэ-год-5")	112	121

Таблица 3

Влияние «Сэ-год-5» на содержание продуктов перекисного окисления липидов в тканях и состоянии эндогенной антиокислительной системы белых крыс при остром повреждении печени тетрахлорметаном (7-е сутки)

Группы животных	МДА в гомогенате печени, нмоль/г	МДА в сыворотке крови, мкмоль/мл мин	Каталаза, мкат/л	SH-группы, ммоль/л
Интактная	0,3 ± 0,02	2,1 ± 0,15	1,8 ± 0,11	24,3 ± 2,40
Контрольная (CCl ₄)	1,2 ± 0,05*	5,8 ± 0,35*	1,0 ± 0,25*	20,5 ± 1,75
Опытная (CCl ₄ + "Сэ-год-5")	0,5 ± 0,01**	2,8 ± 0,15**	2,0 ± 0,15**	24,9 ± 2,12**

Для оценки антиоксидантной активности ЭС «Сэ-год-5» определяли концентрацию малонового диальдегида (МДА) в гомогенатах тканей печени [7] и сыворотке крови [8]. О состоянии антиоксидантной системы судили по активности каталазы [3] и по содержанию сульфгидрильных групп в сыворотке крови.

Полученные данные обработаны статистически с использованием U-критерия Уилкоксона—МаннаУ—итни [5]. Различия считали достоверным при $P \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Полученные в ходе экспериментов данные свидетельствуют, что повреждение печени крыс четыреххлористым углеродом сопровождается развитием синдрома цитолиза и холестаза (табл. 1). Так, к 7 суткам исследования под влиянием указанного гепатотропного яда отмечается повышение активности мембраносвязанных ферментов сыворотки крови белых крыс: активность АЛТ возрастает на 32%, АСТ — на 28%, содержание щелочной фосфатазы повышается на 44%, а общего билирубина — в 2,9 раза по сравнению с данными у интактных крыс.

Введение тетрахлорметана белым крысам сопровождается резко выраженным нарушением экскреторно-выделительной функции печени, на что указывает задержка элиминации ксенобиотиков из организма (табл. 2).

Так, скорость выведения бромсульфалеина (БСФ) и антипирина с желчью у животных, получавших гепатотропный яд, резко снижается, период их полувыведения соответственно на 45% и 21% превышает показатели у интактных крыс (табл. 2).

Как следует из табл. 3, повреждение печени тетрахлорметаном вызывает резкую активацию процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), о чем свидетельствует повышение концентрации продуктов перекисидации липидов в тканях, а также угнетение активности эндогенной антиокислительной системы организма животных контрольной группы. В частности, под влиянием указанного гепатотоксина в сыворотке крови и в гомогенате печени отмечается накопление одного из конечных продуктов процесса перекисного окисления липидов — малонового диальдегида (МДА), снижение активности каталазы и уменьшение концентрации сульфгидрильных групп в сыворотке крови крыс контрольной группы.

При курсовом введении ЭС «Сэ-год-5» в дозе 5,0 мг/кг на 7 сутки на фоне токсического гепатита активность АЛТ и АСТ снижается по сравнению с контролем соответственно на 32% и 28%, содержа-

ние щелочной фосфатазы и билирубина в сыворотке крови снижается в среднем на 32% и 23% соответственно по сравнению с показателями в контроле. Такая же тенденция сохраняется и в последующие сроки наблюдения (14 и 21 сутки). При исследовании на 14- и 21-е сутки эксперимента активность амиторансфераз у крыс опытной группы, получавших ЭС «Сэ-год-5», также была достоверно ниже, чем у животных контрольной группы.

На фоне курсового введения испытуемого средства скорость элиминации БСФ и антипирина с желчью повышается соответственно на 21% и 15% по сравнению с показателями у крыс контрольной группы. Полученные данные свидетельствуют об активации экскреторной функции печени под влиянием испытуемого средства.

Также, установлено, что курсовое введение ЭС «Сэ-год-5» крысам с токсическим гепатитом сопровождается снижением интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Так, концентрация МДА в сыворотке крови и в гомогенате печени животных этой группы снижается соответственно на 59% и 52% по сравнению с аналогичными показателями крыс контрольной группы. Одновременно с этим под влиянием испытуемого средства отмечается повышение мощности антиокислительной системы организма: активность каталазы возрастает в 2,0 раза, а содержание сульфгидрильных групп в сыворотке крови повышается на 20% по сравнению с таковыми у крыс контрольной группы.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что ЭС «Сэ-год-5» при курсовом введении в дозе 50 мг/кг обладает выраженной фармакотерапевтической эффективностью при остром повреждении печени животных тетрахлорметаном, о чем свидетельствует нормализация функционального состояния печени животных на более ранних сроках патологического процесса. В частности, на фоне введения испытуемого фитосредства уменьшаются признаки развития цитолитического и холестатического синдромов; ускоряется элиминация ксенобиотиков благодаря повышению дезинтоксикационной функции печени, а также нормализуются обменные процессы в печени животных. Установлено, что гепатотекторное действие испытуемого средства на фоне острого токсического гепатита обусловлено его способностью ингибировать процессы ПОЛ и повышать мощность эндогенной антиокислительной системы организма, благодаря чему обеспечивается стабилизация мембранных структур гепатоцитов и нормализуется функционирование мембраносвязанных ферментных систем печени, в том числе монооксигеназной системы, обеспечивающей дезинтоксикацию поступающих ксенобиотиков.

Список литературы

1. Венгеровский А.И., Маркова И.В., Саратиков А.С. Методические указания по изучению гепатозащитной активности фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М., 2000. — С. 228-232.

2. Гайсаев Р.О. Влияние гепатопротектора максара на морфофункциональное состояние печени у больных хроническим гепатитом: Автореф. дисс. на соиск. к.м.н. — Томск, 2000. — 30 с.

3. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. — 1988. — №6. — С. 16-19.

4. Меньшиков В.В. (ред.) Лабораторные методы исследования в клинике. — М., 1987. — 368 с.

5. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. — М., 2000. — 263 с.

6. Соловьев В.И., Егоренко Г.Г., Фирсов А.А. Использование математической модели фармакокинетики при изучении функции печени у белых крыс методом бромсульфалеиновой пробы // Лабораторное дело. — 1976. — №9. — С. 538-542.

7. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. — М., 1977. — С. 66-68.

8. Темирбулатов Р.А., Селезнев Е.И. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // Лабор. Дело. — 1981. — №4. — С. 209-211.

Поступила 04.06.13

Сведения об авторах:

Дашинамжилов Жаргал Балдуевич — к.м.н., ст. науч. сотр. лаборатории безопасности биологически активных веществ Института общей и экспериментальной биологии СО РАН

Туртуев Цыбикжап Доржиевич — врач-ординатор Автономного учреждения здравоохранения: Республиканской клинической больницы восстановительного лечения, центр восточной медицины

И.С. Гушин

Эволюционное предупреждение: аллергия

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, 115478, Москва, Каширское ш., д.24, корп. 2

В работе приведены сведения о филогенезе аллергической реактивности, наиболее вероятных предшественниках аллергических антител изотипа IgE, высокоаффинного рецептора I типа для IgE ($Fc\epsilon RI$), сравнении характера взаимодействия IgE с $Fc\epsilon RI$ и IgY с CHIR-ABI. Обосновано представление об аллергии как эволюционно отобранной форме реактивности высокоорганизованных животных, направленной на осуществление аллерген-специфического воспаления. Аллергическая реактивность рассмотрена как биологически целесообразная высокоспецифичная и высокочувствительная реакция на аллергенное поступление в организм вследствие нарушения функции барьерных тканей. Приведено обоснование необходимости изучения последствий радикального устранения (утраты) аллергической реактивности для высокоорганизованных животных и их потомков.

Ключевые слова: филогенез аллергии, IgE, IgY, $Fc\epsilon RI$, $Fc\gamma R$, Ig-подобный рецептор кур, CHIR, анафилаксия, дисфункция эпителиального барьера

I.S. Gushchin

Evolutionary admonition: allergy

Institute of immunology, Moscow

The paper concerns phylogeny development of allergic reactivity, the most probable antecedents of allergic IgE antibodies, high affinity IgE receptor ($Fc\epsilon RI$), presents comparative character of IgE - $Fc\epsilon RI$ and IgY - CHIR-ABI interactions. The paper has given an insight of allergy as evolutionary selected reactivity for highly organized animals. This reactivity is directed to organization of allergen-specific inflammation and serves as biologically expedient, high-specific and high-sensitive reaction in response to allergen entering into the organism because of barrier tissue dysfunction. Such insight has raised a question on consequences of thoroughgoing allergy reactivity elimination for highly organized animals and their posterity.

Key words: allergy phylogeny, IgE, IgY, $Fc\epsilon RI$, $Fc\gamma R$, chicken Ig-like receptor, CHIR, anaphylaxis, epithelial barrier dysfunction

Von Pirquet в 1906 г. в ставшей теперь классической статье (на двух страницах), названной «Аллергия», использовал этот термин для обозначения состояния измененной реактивности организма по отношению к антигену, вне зависимости от того, проявляется ли оно устойчивостью (иммунитетом) к нему или гиперчувствительностью. Общепатологическое значение такого понимания термина остается до сегодняшнего дня предметом специального обсуждения [1]. Между тем, в широких кругах научных и медицинских работников этот термин давно стал использоваться только как синоним аллерген-специфической гиперчувствительности. Именно в таком понимании он применен и в настоящей работе.

Особенность последних десятилетий состоит в том, что исследования аллергии, равно как и других биомедицинских эффектов, направлены преимущественно на детализацию известных процессов, но не вносят принципиально нового в понимание смысла изучаемого явления. За относительно короткий интервал времени получен невероятно объемный мате-

риал, касающийся всех без исключения участников и звеньев развития аллергического ответа. Постоянно и с большой интенсивностью пополняются сведения об индивидуальных компонентах аллергенов разных классов [см.: <http://www.allergen.org/>]. Одновременно с ошеломляющими успехами иммунологии, в деталях осуществляется расшифровка Th2-типа иммунного ответа, ведущего к образованию уникального иммуноглобулина E — IgE. Структура самого IgE сравнительно давно установлена, подробно иллюстрированы его функции и главная из них — опосредование аллергической реакции немедленного типа у млекопитающих. Осуществлена расшифровка строения высокоаффинного рецептора I типа ($Fc\epsilon RI$), установлены типы клеток, экспрессирующих этот рецептор, определены функциональные свойства его субъединиц. Довольно полно охарактеризован механизм активации клетки посредством перекрестного связывания молекул рецептора иммуноглобулина взаимодействием поливалентного лиганда (аллергена) с фиксированными на рецепторах молекулами IgE. Каскад

запускаемых этим взаимодействием событий, происходящих в клетке, также тщательно изучен и установлен в деталях вплоть до этапов секреции предсуществующих в клетках-мишенях медиаторов и образующихся посредников в результате клеточной активации. Все эти процессы неоднократно подробно рассматривались в научной печати и широко представлены в обобщающих работах, в том числе и самого последнего времени [2—6].

Даже это краткое напоминание наиболее значительных этапов аллергического процесса позволяет заметить главную сущность этого типа реактивности, состоящую в организации воспалительного ответа, специфически направленного на воздействующий аллерген. В свое время была сделана попытка представить аллергию как результат объединения двух форм реактивности: более древней реакции воспаления и сравнительно поздней — иммунологической реактивности за счет вооружения клеток воспаления инструментом молекулярного специфического распознавания — уникальным типом антител, принадлежащих к иммуноглобулину E [7]. Благодаря приобретению такого инструмента воспалительная реакция, помимо своей универсальной функции отвечать на любой вид повреждения, получила возможность реагировать на конкретные молекулы, обладающие повреждающим потенциалом.

Прототипы аллерген-специфической гиперчувствительности

Если в сравнительной патологии воспаление давно было предметом исследований, то эволюции аллергической реактивности посвящено крайне ограниченное число обобщающих работ [8—10]. Причем, с позиций современных иммунологических знаний многие явления, описанные в ранний период изучения аллергии, оказываются трудно объяснимыми. Работы, относящиеся к этой проблеме, были выполнены в 1-й половине XX века, преимущественно в 20—30-е годы, и феномены, причислявшиеся к анафилактическим, воспроизводили на представителях животного мира, которые вообще не имеют функциональных единиц, участвующих в немедленной аллергии. Поэтому трудно допустить, что описанные феномены, если они действительно воспроизводимы, имеют отношение к анафилаксии. Примером может быть попытка воспроизведения «анафилактической реакции» у простейших — инфузорий [11]. Наблюдение состояло в том, что после 4-часового выдерживания инфузорий в присутствии кроличьей антисыворотки, содержащей преципитирующие антитела к яичному белку, и отмывания их свежей инкубирующей жидкостью к клеткам добавляли антиген (яичный белок). Затем оценивали реакцию инфузорий. Она была

сходной во всех 5 выполненных опытах и состояла в появлении через 5 мин после добавления антигена толчкообразных движений отдельных инфузорий, быстрой смене направления движения, сворачивании клеток «конец к концу» с последующим затиханием, перемещением к краю капли, где клетки уплощались, замирали, но движение ресничек сохранялось. В начале реакции заметно было уменьшение размера клетки и затемнение цитоплазмы. Автор работы расценила эти результаты как доказательство возможности пассивной сенсibilизации инфузорий антителами и воспроизведения реакции на добавление антигена, аналогичной анафилаксии гладкомышечных органов. Понятно, что сегодня такое толкование описанных опытов не может быть принято, и остается неясным, каков механизм реагирования инфузории на реакцию антиген-антитело. К сожалению, это единственное наблюдение в дальнейшем не было повторено и, соответственно, не проанализировано.

Не легче оценить работу той же исследовательницы [12], введившей дождевым червям антиген (кроличью сыворотку крови), полагая, что этим достигается иммунизация особей. Затем в условиях *in vitro* к полостям гладких мышц сенсibilизированных червей добавляли антиген, в результате чего воспроизводилась сократительная реакция, расцененная как анафилактическая. Эти данные, как и данные предыдущей работы, никем не были в последующем подтверждены.

Такого же характера результаты описаны на других представителях беспозвоночных — ракообразных (на речном раке): через 21 день после введения животному антигена (сыворотки крови человека) повторная инъекция того же антигена сопровождалась развитием реакции, характеризовавшейся повышенной раздражимостью и завершавшейся гибелью особей [13].

Все эти единичные наблюдения нуждаются в тщательной проверке, а в случае их подтверждения — в анализе с использованием современных знаний и методов исследования. В случае подтверждения даже некоторых из этих сведений могли бы возникнуть интересные новые направления, выходящие за рамки алергологических проблем.

Как известно, лимфоидная иммунная система, обеспечивающая реакции приобретенного иммунитета, появляется у позвоночных, а у костистых рыб происходит разделение функций между Т- и В-лимфоцитами. Поэтому данные, полученные на позвоночных, представляют больший интерес. Правда, в этой части имеется существенный пробел, так как сведения о примитивных позвоночных тоже довольно ограничены и не привлекают к себе внимания исследователей в последнее время. В этой связи можно указать на отдельные попытки воспроизведения от-

ветных реакций, подобных анафилаксии, на примитивных позвоночных. Примеры активной анафилаксии на растворимые белковые антигены (лошадиную сыворотку и овальбумин) описаны у разных представителей костистых рыб [14]. Достаточный период сенсибилизации составлял в этих случаях не менее 10 дней. Вместе с тем, не удавалось воспроизвести реакцию типа Шульца-Дейла на изолированном сердце или гладкомышечных органах. Были также обнаружены и другие особенности, отличающие реакцию рыб от известных примеров анафилаксии млекопитающих.

Бесхвостые земноводные (лягушки) и пресмыкающиеся занимают промежуточное эволюционное положение между рыбами и млекопитающими по способности продуцировать иммуноглобулины. У них впервые появляется способность продуцировать, вслед за IgM, иммуноглобулин G. Данные о возможности активной анафилаксии у лягушек довольно противоречивы. Имеется несколько работ (см. [14]), опровергающих появившиеся сведения о возможности воспроизведения сывороточными белками или белком куриных яиц подобия анафилактической реакции у лягушек. Вместе с тем, сходную с анафилактической реакцией удавалось получить у лягушек, иммунизированных вакциной *Salmonella typhosa*, при разрешающем введении растворимого бактериального антигена [15], что позволило рассматривать ответную реакцию лягушек как раннюю филогенетическую форму, отличную по характеру распознаваемого типа антигена и вида сывороточных антител от таковых, ответственных за механизм гиперчувствительности вышестоящих по эволюционному развитию гомойотермных животных.

Реакции на белковые антигены, подобные активной анафилаксии, описаны у пресмыкающихся: черепаха [16] и ящерица [17]. Но и эти описанные состояния остаются до настоящего времени без какого-либо анализа.

У птиц (в частности, голубей и кур) описаны системные, тканевые, органые проявления анафилаксии, сходные с таковыми млекопитающих (см. [10]).

Системная анафилаксия (анафилактический шок) может быть воспроизведена у взрослых кур, сенсибилизированных бычьим сывороточным альбумином, и проявляется падением артериального давления, сопровождающимся центральной венозной гипертензией и брадикардией. Ингибиторы калликреина, антагонисты простагландина $F_{2\alpha}$, медленно-действующего вещества анафилаксии, циклооксигеназы подавляли вызванные антигеном нарушения функции сердечно-сосудистой системы, что позволило предположить важную роль вазоактивных липидов и полипептидов в анафилаксии этого вида животных [18].

Тканевая анафилактическая реакция кур была в свое время изучена на классической модели — пассивной кожной анафилаксии (ПКА). При этом было обнаружено, что ПКА кур имеет определенные особенности. Она легко воспроизводится у цыплят (оптимальными для этих целей являются 10-дневные цыплята) сывороткой крови, полученной от взрослых кур, иммунизированных белковым антигеном (бычьим сывороточным глобулином [19] или альбумином [20]). У взрослых же кур ПКА воспроизвести практически не удается. Гистологическая картина кожной реакции принципиально соответствует таковой ПКА млекопитающих, но не обратному феномену Артюса [19], хотя сам феномен Артюса на курах удается получить [21]. Одним из возможных объяснений того, что ПКА кур воспроизводится лишь у цыплят, является низкая кожная реактивность (оцененная по кожной реакции на гистамин) у взрослых особей [20]. Другой особенностью является то, что ПКА кур воспроизводится с коротким латентным периодом: максимальное число положительных результатов возникло через 4 ч после внутрикожного введения сенсибилизирующей сыворотки [20]. В этом отношении ПКА кур напоминало ПКА млекопитающих (морских свинок, крыс, мышей и пр.), воспроизводимую соответствующими гомоцитотропными антителами, принадлежащими к $\gamma 1$ субклассу IgG (IgG1 или IgGa у крыс) и не фиксирующимися в ткани продолжительное время. Сывороткой крови активно сенсибилизированных кур удается пассивно сенсибилизировать кожу перепелов (близких родственников), но не уток (птиц другой порядковой принадлежности) [20].

Анафилактическая реакция воспроизводима и на изолированных гладкомышечных органах (на полосках циркулярных гладких мышц пищевода, зоба, 12-перстной кишки, тощей, подвздошной кишки [22], полосках легочной артерии и вены [23]) активно сенсибилизированных взрослых кур и цыплят [22]. Реакция гладких мышц кишечника, как и системная анафилаксия [18], опосредуется, по-видимому, не биогенными аминами, а вазоактивными липидами и пептидами [22]. Если это действительно так, то набор медиаторов, опосредующих анафилаксию кур, существенно отличается от набора основных посредников анафилаксии млекопитающих. Правда, нельзя обойти вниманием и сравнительно давно сделанное наблюдение о том, что антигистаминные препараты тормозят развитие ПКА у кур (см. [19]).

Клеточная анафилаксия также, видимо, может воспроизводиться на материале кур. Во всяком случае, известно, что сыворотка крови кур, иммунизированных эритроцитами барана или птичьим туберкулином, содержит цитотоксические антитела по отношению к базофилам [24]. Методом розеткообразования по-

казано существование двух типов цитофильных антигенов: термостабильных, устойчивых к восстанавливающему действию меркаптоэтанола и термолабильных, неустойчивых к меркаптоэтанола. Эти сведения позволяют подозревать существование гетерогенности птичьих гомоцитотропных антител, как это известно у млекопитающих. В отдельном наблюдении показана также возможность пассивной сенсibilизации и эозинофилов.

Важным итогом результатов исследований, приведенных выше, является обоснование заключения о том, что прообраз немедленной аллергической реакции появляется еще до разветвления эволюционного дерева в сторону млекопитающих. Но прообраз этот, как показано выше, еще далек от совершенства, достигаемого у млекопитающих и, в особенности, у человека. Данные, полученные на птицах, подтверждают, что эволюция происходила в направлении создания вооружения клеток воспаления высокоспецифичным механизмом распознавания чужеродного антигенного материала (предшественником такого механизма может быть отчасти и рецепция IgG клетками воспаления). Иными словами, начинал формироваться высокоспецифичный способ индивидуального распознавания отдельных молекул и запуска высокоспецифичной воспалительной реакции. Это коренным образом отличалось от механизма группового распознавания и активации клеток воспаления более древними реакциями врожденного иммунитета.

На сегодня можно лишь с уверенностью утверждать, что полноценно анафилактический тип реакции гиперчувствительности представлен у теплокровных млекопитающих. У холоднокровного вида млекопитающих — голого землекопа (*naked mole rat*, *англ.*, *Heteroscephalus glabe*, *лат.*) — не производились попытки воспроизвести ни аллергическую реакцию, ни изучить характер иммунного ответа вообще. Определенно не известно время возникновения в ходе эволюции ключевых молекул, от которых зависит возможность аллергического ответа: ни высокоаффинного рецептора для IgE (Fc_εRI), ни самого иммуноглобулина E.

Некий прототип функции IgE может обнаруживаться у подклассов IgG, обладающих слабой гомоцитотропной активностью, но их способность фиксироваться на клетках воспаления крайне низкая и непродолжительная [10, 25] и ни в какое сравнение не идет с IgE.

Наиболее вероятные предшественники IgE и Fc_εRI

Полагают, что далеким предшественником IgE может быть иммуноглобулин Y (IgY). Этот иммуноглобулин обнаружен у рептилий, амфибий, птиц [26, 27]. Наиболее полно он изучен у птиц. У птиц известны антитела, принадлежащие к трем классам иммуноглобулинов: IgM, IgA и IgY. Указанные изотипы были идентифицированы у кур и уток [28], которые среди других представителей птиц являются в этом отношении наиболее изученными. Имеются лишь крайне ограниченные сведения об антителах других представителей птиц, в частности, попугаевых [29] и страусовых [30]. IgY функционально проявляет свойства IgG. И тот, и другой иммуноглобулины содержатся в сыворотке крови в высокой концентрации (около 10 мг/мл) и обеспечивают адаптивный иммунитет к микробным инфектам. Дупликация гена, кодирующего тяжелые цепи IgY, произошла приблизительно, как считают, 160-130 млн лет тому назад в ходе эволюции млекопитающих (см. [31]) и позволила осуществиться дивергенции на IgG и IgE [32, 33], последний из которых получил привилегию выполнять противопаразитарный иммунитет и реакции аллергии. Этого не произошло у птиц и рептилий, у которых предковый изотип иммуноглобулина остался сохранным. Следовательно, сравнительный подход к изучению IgY представляет собою прием для выяснения эволюционных изменений, позволивших IgG и IgY приспособиться к выполнению разных функций у современных млекопитающих [27]. Хотя IgY функционально подобен IgG, его структура обеспечивает сохранение свойств как IgG, так и IgE (см. [31]).

Установление последовательности нуклеотидов в ДНК, кодирующей тяжелые цепи IgY (ипсилон цепи, Υ -цепи), показало, что подобно IgY амфибий, IgY птиц содержит пару доменов (C Υ 2), которые сохранились у IgE млекопитающих, но были удалены в ходе эволюции из IgG млекопитающих, что позволило образоваться «шарнирной» области в IgG [34] (рис. 1).

У уток описан укороченный (на 2 пары константных доменов в C-концевой области тяжелых цепей) вариант IgY [28]. Эта укороченная форма IgY (5,7 S), обозначаемая как IgY(Δ Fc), образуется у некоторых видов черепах (см. [28]), а потому образование такой формы иммуноглобулина не ограничено

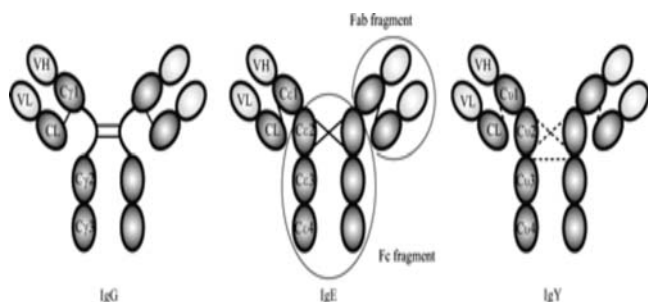


Рис. 1. Сравнение строения IgG и IgE млекопитающих и IgY птиц (по [34])

утками. Функциональное назначение укороченной формы IgY недостаточно понятно.

Результаты сравнительных исследований ν -цепей аксолотля и шпорцевых лягушек согласуются с гипотезой о существовании предковых структурных взаимоотношений между ν -цепями амфибий и птиц и ϵ -цепями млекопитающих [35]. В связи со сказанным представляет интерес сделанное выше упоминание попыток воспроизведения подобий анафилактических реакций у лягушек [15, 36]. К сожалению, как уже отмечено, эти данные не подвергались в последующем глубокому анализу и не получили экспериментального развития.

Для IgY описан и довольно подробно изучается в последнее время клеточный рецептор, связывающий Fc-фрагмент этого иммуноглобулина (Fc_{ν}) с высокой степенью аффинности [31, 34, 37-41]. Лейкоцитарный рецепторный комплекс (leukocyte receptor complex — LRC) у птиц находится на 31-й хромосоме [у человека этот комплекс локализован на хромосоме 19q13.4 и содержит более 40 генов, включая семейство иммуноглобулин(Ig)-подобных рецепторов клеток-киллеров и Ig-подобных рецепторов лейкоцитов], в которой зашифровано одно семейство генов, называемое CHIR (chicken Ig-like receptor) генами. Гены CHIR — очень значительное, разнообразное и полиморфное мультигенное семейство генов, ответственных за экспрессию более 100 белков. Их классифицируют как трансмембранные белки I типа с одним или двумя Ig-подобными доменами, представленными на клеточной поверхности, и подразделяют на активирующие (CHIR-A), ингибирующие (CHIR-B) или бифункциональные (CHIR-AB) (см.[41]). Активирующий рецептор имеет короткий цитоплазматический хвост без какого-либо сигнального мотива, но трансмембранный домен содержит положительно заряженный остаток. Этот заряженный остаток обеспечивает взаимодействие рецептора с адапторной молекулой, подобной γ -цепи $Fc_{\epsilon}RI$ ($Fc_{\epsilon}RI\gamma$), активирующей ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activating motif) [37]. Тормозящие (ингибирующие) рецепторы не имеют такого заряженного остатка в трансмембранном домене, но снабжены длинным цитоплазматическим хвостом, содержащим ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif). Бифункциональные (CHIR-AB) рецепторы обладают обоими свойствами: имеют положительно заряженный остаток в трансмембранном домене и длинный цитоплазматический хвост, включающий два ITIM. Бифункциональные CHIR-AB1 связываются с Fc_{ν} . Специальный анализ, выполненный на материале разных линий кур, позволил идентифицировать около 20 генов CHIR-AB с разной связывающей способностью по отношению к IgY: от неопределяемой до высокоаф-

финной. За связывание CHIR-AB1 с IgY ответственен единственный внеклеточный домен рецептора, представленный на наружной стороне клеточной мембраны. Связывание зависит от ключевых 5 аминокислотных остатков, образующих участок связывания. Установлено необычное соотношение рецептор/иммуноглобулин в образующемся комплексе: две молекулы CHIR-AB1 связывают одну молекулу IgY (соотношение 2:1) [38, 39], а не 1:1, как это соответствует взаимодействию $Fc_{\epsilon}RI$ с IgE (рис. 2).

Установление взаимодействия CHIR-AB1 с IgY в соотношении 1:1 приводит к образованию низкоаффинного комплекса, а соотношение 2:1 характеризуется повышением аффинности вследствие эффекта avidности, когда рецептор был привязан к поверхности [38]. За связывание с CHIR-AB1, скорее всего, ответственен участок в области $C_{\nu}3/C_{\nu}4$ -доменов IgY. По соотношению 2:1 и участкам связывания, взаимодействие IgY с CHIR-AB1 напоминает взаимодействие $Fc_{\alpha}RI$ с $C_{\alpha}2/C_{\alpha}3$ -доменами IgA [40].

CHIR-AB1 экспрессирован на незрелых и зрелых В-лимфоцитах, моноцитах, макрофагах и натуральных клетках-киллерах кур (см. [37]).

Что касается распространенности представленности CHIR у разных видов птиц, то данные на этот счет крайне скудные и довольно обескураживающие. Дело в том, что у других исследованных видов птиц, за исключением кур, аналоги CHIR не найдены. Например, CHIR не идентифицирован у уток, но у индюков, близких родственников кур, описан прототип CHIR (ген располагается на 3-й хромосоме генома индюка) [41], обозначенный как TILR (turkey Ig-like receptor). На основании оцененных последовательностей сделано заключение о том, что эти рецепторы представлены одним активирующим типом рецептора

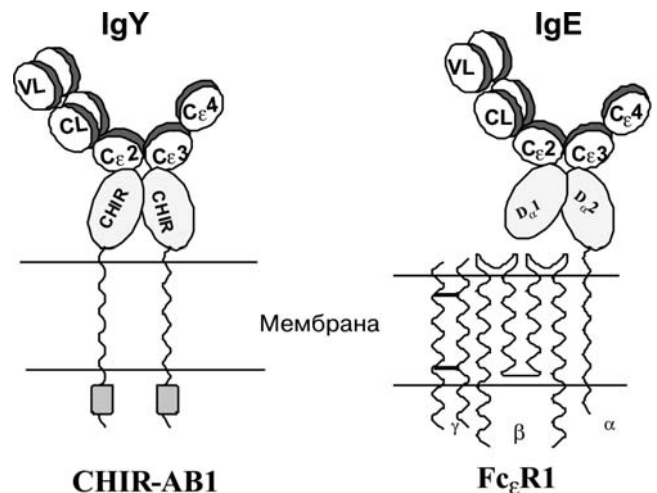


Рис. 2. Сравнение моделей взаимодействия IgY с CHIR-AB1 (одного из трех вероятных вариантов) [38] и IgE с $Fc_{\epsilon}RI$ [2]

(TILR-A), одним ингибирующим (TILR-B) и четырьмя бифункциональными (TILR-AB). Особенность клеточного представительства состояла в том, что рецептор в большей степени был представлен на тромбоцитах, а не на лимфоцитах.

О предназначении аллергии

Сказанное, в свою очередь, ставит, по крайней мере, следующие два вопроса. Во-первых, что сделало необходимым появление аллергической реактивности и, во-вторых, каково целевое назначение этого вида реактивности, достигающее совершенства у наиболее совершенных животных организмов.

Что касается первого вопроса, то в настоящее время становится все более ясным побудительный мотив возникновения аллергической реактивности. Ранее нами была предложена концепция целесообразности аллергического ответа у высокоорганизованных животных [7] при поступлении во внутреннюю среду организма чужеродного антигенного материала в ничтожных количествах, которые еще не могут индуцировать антиген-специфическую реакцию воспаления, опосредуемую другими механизмами приобретенного иммунитета [42, 43]. Видимо, именно для высокоорганизованных животных такие количества проникающего в организм антигена являются небезразличными, а потому должны быть распознаны высокочувствительной реакцией.

Тем самым, вместо распространенного взгляда на аллергию как реакцию, возникающую вследствие повреждения («поломки») иммунной системы (именно — иммунопатологии), было предложено другое представление об аллергии как необходимой реакции при неполноценности гистогематических барьеров, допускающей в организм чужеродный антигенный материал из окружающей среды. В этом и усматривалась биологическая целесообразность аллергической реактивности [7]. Соответственно, повышение барьерной проницаемости рассматривалось как важнейшая форма предрасположения к аллергии, определяющая быть или не быть аллергическому ответу.

Данные последнего времени все более подтверждают справедливость такого представления. Соответствующий фактический материал был обобщен и систематизирован нами в ранее опубликованных работах [44-46]. Повышение проницаемости к аллергенам установлено у больных с атопией на всех барьерных тканях, через которые аллерген может проникнуть в организм: на коже, слизистых оболочках дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта. Многими наблюдениями подтверждено, что повышение проницаемости тканевых барьеров может быть обусловлено как генетически опосредованными механизмами, так и средовыми воздействиями. Следует заметить, что

среди разнообразных предполагаемых механизмов могут быть те, которые направлены на повышение проницаемости по отношению только к определенному или определенным аллергенам. Так, у больных поллинозом с гиперчувствительностью к пыльце березы повышение проницаемости слизистой конъюнктивы вне сезона цветения (в зимнее время года) обнаружено к аллергену березы (Bet v 1), но не к аллергену тимофеевки, к которому у данного пациента не было повышенной чувствительности [47]. Многие аллергены, включая аллергены клещей домашней пыли, содержат разные биохимически активные молекулы, которые повышают проницаемость эпителиального барьера, но, кроме того, могут облегчать и развитие сенсibilизации к поступающему через тканевый барьер аллергену за счет стимуляции образования провоспалительных цитокинов и активации клеток, участвующих в иммунном ответе. Ранее полагали, что главным фактором повышения эпителиальной проницаемости является протеолитическая активность аллергена клещей домашней пыли. Однако позже оказалось, что нарушение функции эпителиального барьера и продукция провоспалительного хемокина (CCL20) могут не зависеть от протеазной активности [48]. Поэтому сложный и изменчивый состав естественного материала клещей домашней пыли может быть ответственен за избирательное повышение проницаемости барьерной ткани к аллергенам клещей и облегчение сенсibilизации к этим аллергенам.

Обусловленный повышенной барьерной проницаемостью механизм предрасположения к аллергии стал рассматриваться в настоящее время как основа специальных форм аллергической патологии. Например, выделены формы атопического дерматита, обусловленные генетическим дефектом барьерной функции или негенетическими нарушениями (сухость кожи, расчесы, микробные, токсические воздействия, фототоксический эффект и пр.) [49].

Взгляд на аллергию как неизбежную реакцию, возникающую в ответ на поступление в организм антигена вследствие нарушения оградительной функции барьерных тканей, позволяет приблизиться к ответу на второй поставленный вопрос: какое целевое назначение аллергической реактивности и чем может грозить высокоорганизованному животному радикальное устранение этого эволюционного приобретения. Ответить на этот вопрос могли бы помочь эксперименты, в которых были бы созданы условия, позволяющие предотвратить возникновение немедленного аллергического ответа (IgE-опосредованного) не только у данной особи, но и у ее прямых и отдаленных потомков с тем, чтобы оценить отдаленные последствия такого вмешательства. Очевидно, что неузнаваемое персистирующее присутствие в высокоорганизован-

ном животном низких концентраций антигенов, действительных носителей чужеродной генетической информации, может иметь неожиданные последствия, проявляющиеся в отдаленном потомстве. Клинические наблюдения, которыми располагает современная медицина, не позволяют заглянуть в эту проблему, так как опыт эффективного подавления аллергической реактивности пока что (возможно, к счастью) непродолжительный и ограничен периодом начавшегося широкого применения противовоспалительных (противоаллергических) лекарственных средств и анти-IgE терапии. Тем не менее, не следует забывать, что сейчас ведутся интенсивные исследования, направленные на создание новых лекарственных средств именно радикального устранения IgE-опосредованной аллергии. В качестве примера можно привести экспериментальное получение Fc ϵ RI-миметика, представляющего собою пептид, содержащий ключевые две петли α -цепи Fc ϵ RI, которые, как известно, взаимодействуют с ϵ -цепями IgE. Этот пептид, имеющий высокий аффинитет и специфичность по отношению к IgE, препятствует связыванию IgE с Fc ϵ RI и при однократном введении предупреждает пассивную сенсibilизацию мышей, дефицитных по продукции IgE, аллерген-специфическим IgE, а при 3-недельном использовании обеспечивает блокаду активной анафилаксии полноценных по продукции IgE мышей [50]. Комбинированное применение таких препаратов и средств, инактивирующих функцию других ключевых участников аллергического ответа, вполне вероятно, позволит в недалеком будущем лишить организм способности реагировать реакциями гиперчувствительности I типа. В связи со сказанным становится актуальным заблаговременная организация исследований, направленных на выяснение возможных (не исключено, что и нежелательных) отдаленных последствий радикального устранения аллергической (IgE-опосредованной) реактивности.

Для достижения этих целей наиболее доступными могли бы стать опыты на лабораторных животных, дефицитных по ключевым составляющим звеньям аллергического ответа (на IgE-, Fc ϵ RI-дефицитных мышцах, на мышцах, дефицитных по тучным клеткам и пр.). Однако результаты таких опытов могут оказаться не столь уж однозначными. Дело в том, что устранение IgE-зависимого ответа и главных его составляющих может привести к оживлению альтернативных путей, которые в слабовыраженной форме эволюционно возникли как предшественники классической немедленной аллергии. Действительно, сказанному можно найти подтверждение среди экспериментальных данных, полученных на примере изучения анафилактических проявлений у животных, дефицитных по способности продуцировать антитела изо-

типа IgE [51], по тучным клеткам [52, 53] или по α -субъединице Fc ϵ RI [54]. Правда, при оценке этих данных следует иметь в виду, что они получены на мышцах (наиболее доступном в настоящее время объекте исследования), которые, по-видимому, имеют ряд особенностей механизма анафилаксии. В частности, это касается отчетливых различий IgE-опосредованных и неIgE-опосредованных механизмов реакции. Первый из них можно считать классическим механизмом, принципиально соответствующим таковому немедленной аллергии человека. Второй механизм (так же как и предыдущий — комплемент-независимый) опосредуется антителами изотипа IgG, протекает с участием не тучных клеток, а макрофагов, в него вовлекаются Fc γ RIII и в качестве главного посредника — не гистамин, а фактор, активирующий тромбоциты (см. [43]). Из-за ограниченности сравнительных данных, полученных на других видах животных, трудно сделать окончательные суждения о том, насколько механизмы IgG-опосредованной анафилаксии, выявляемые на мышцах, имеют универсальное значение. Таким образом, проведению опытов с воспроизведением радикального устранения немедленной аллергической реакции должна еще предшествовать разработка специальной модели с подтверждением полноты такого устранения.

Вероятность естественной исходной толерантности к аллергенам

Как показано на примере IgE-опосредованной гиперчувствительности I типа, аллергический ответ индуцируется низкими дозами аллергена, а антигенная стимуляция в высоких дозах вызывает другие формы иммунного ответа и развитие толерантности. Это продемонстрировано в разных вариантах опытов на экспериментальных животных, а также в клинике при изучении механизма аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ) [2]. Существуют примеры выбора организмом характера иммунологического реагирования в естественных условиях в зависимости от дозы аллергена. Многократно показано, что гиперчувствительность I типа к яду перепончатокрылых формируется у лиц, подвергавшихся спорадическому ужалению [55]. Известно, что даже одного или нескольких ужалений перепончатокрылыми бывает достаточным для развития сенсibilизации. В течение 1-го месяца после ужаления более чем у 30% взрослых удается установить сенсibilизацию к яду. Затем, при отсутствии повторных ужалений, кожные пробы становятся отрицательными у 30% этих пациентов через 2 года и приблизительно у 50% через 3 года (см. [56]). Пчеловоды же подвергаются многократным воздействиям высоких доз аллергена яда пчел. Полагают, что 13 ужалений пчелами обеспечивают высокую дозу

аллергена, соответствующую 65 мкг фосфолипазы A₂, введенной внутривенно. Под действием таких доз аллергена у пчеловодов формируется устойчивость к яду, обусловленная переключением на другой тип иммунного ответа и формированием аллерген-специфической Т-клеточной толерантности (индукцией регуляторных аллерген-специфических Th1-клеток) [56]. Это происходит, как видно, в условиях, характеризующихся периодически повышающейся до высоких уровней концентрации аллергена. Эти сведения согласуются с результатами изучения механизма АСИТ и экспериментальными данными, свидетельствующими о том, что массивные дозы антигена индуцируют формы иммунного ответа, которые делают необязательной формирование аллергической реактивности.

В связи со сказанным представляет интерес давно известный факт, состоящий в том, что среди сельского населения, несмотря на высокие концентрации пыльцевых аллергенов в окружающей среде, наблюдается значительно меньшая распространенность пыльцевой аллергии, чем среди городского населения, находящегося в условиях воздействия относительно низких концентраций аллергена. В свое время выдвигалось много предположений для объяснения этого факта, большинство из которых сводилось к допущению действия неблагоприятных аллерген-неспецифических факторов городской среды. При этом не рассматривалась вероятность возникновения аллерген-специфической толерантности к аллергенам пыльцы растений, формирование которой могло облегчаться незначительной миграцией сельского населения за пределы привычных климатогеографических зон. В таких условиях могло обеспечиваться антенатальное воздействие на плод аллергенов привычного окружения еще в тот период, когда существуют наи-

более благоприятные условия формирования иммунологической толерантности. Такое предположение может быть обоснованным в том случае, если существует трансплацентарный доступ экзоаллергенов к плоду. Действительно, в ряде работ такая возможность была установлена. Так, показано присутствие клещевого аллергена Der p 1 в аллантоисной жидкости и кровотоке плода, что является прямым свидетельством трансамниотической и трансплацентарной аллергенной экспозиции [57]. В других работах показана аллерген-специфическая Т-клеточная реактивность клеток пуповинной крови к разнообразным пищевым и ингаляционным аллергенам (см. [58]), что свидетельствовало о воздействии на плод, возможно, в ранний (около 20-й нед.) период беременности аллергенов, поступающих от матери, находившейся в контакте с ними [58]. В экспериментальных условиях показано, что пренатальная аллергенная экспозиция (овальбумином) приводила к толерантности или сенсibilизации потомства в зависимости от времени воздействия и количества вводимого орально аллергена самкам-мышам в период беременности [59]. При этом нельзя не принимать во внимание и влияние проходящего через плацентарный барьер аллерген-специфического IgG1 [60, 61].

Обобщение существующих данных о внутриутробном воздействии аллергена на плод и влиянии этого воздействия на сенсibilизацию плода и потомства пока что не позволило прийти к четким выводам и объяснить существующие противоречия результатов наблюдений [62-64].

Не вызывает возражения общее положение о том, что определенный период развития плода является критическим для последующего развития или, напротив, невозможности развития атопических заболеваний [62]. Однако данные, позволяющие создать яс-

Таблица

Основные этапы внутриутробного развития иммунной системы плода (по [69])

Основные показатели	Сроки и периоды вынашивания: неделя (триместр)
Дифференцировка макрофагов и их диссеминация	С 4-й нед. (I)
Заселение тимуса пре-Т-клетками	С 6-й нед. (I)
Начало продукции В-клеток в печени	Около 6-й нед. (I)
Продукция IgE в печени	После 8-й нед. (I)
Продукция IgE в селезенке и легких	С 11-й нед. (I)
Образование коркового слоя в тимусе	С 11-й нед. (I)
Начало лимфопоэза в костном мозге	С 12-й нед. (I)
Завершение образования центральной зоны тимуса	15-16-я нед. (II)
Т-клеточная клональная экспансия	С 13-й нед. (I)
Определение IgM в кровотоке	С 19-й нед. (II)
Образование аллерген-специфических и противомикробных антител	С 23-й нед. (II)
Развитие способности к Th1-ответу	С 37-й нед. (III)

ную и убедительно аргументированную картину связи эмбрионального развития плода, аллергенного воздействия на него и организм матери с возможностью последующего проявления атопии, неоднозначны и недостаточно информативны.

Показано, например, что экспозиция аллергеном собак в конце эмбрионального периода и сразу после рождения ребенка сопряжена с такими изменениями иммунной системы, которые могут проявляться угнетением возможности возникновения в последующем атопии [65]. Однако эти результаты принципиально не подтверждены в другом исследовании [66]. Существуют отдельные указания на связь между сезоном пыления растений, появления на свет детей и проявлениями атопии в последующий период наблюдения (до 12—15 лет). В группе 209 детей, рожденных в период сезона пыления аллергенных деревьев, реже развивался аллергический риноконъюнктивит и реже определялись антитела (изотипа IgE) к аллергену пыльцы деревьев, чем у детей, рожденных в другое время года [67]. В другой работе, выполненной на 1007 случайно отобранных детях в возрасте от 7 до 17 лет, не удалось установить связи атопии как таковой с определенным сезоном рождения [68].

Помочь ответить на вопрос о характере последствий антенатального воздействия на плод аэроаллергенов естественного окружения могли бы эпидемиологические исследования, проведенные в регионах с распространением продолжительно действующего, но в пределах четко ограниченного сезона, сильного аллергена (например, пыльцы амброзии) на группах лиц из числа коренного населения и приезжих (из регионов, в которых отсутствует данный аллерген) с учетом периодов зачатий. В числе прочих важных учитываемых обстоятельств при планировании таких эпидемиологических исследований следует иметь в виду, что IgE начинает образовываться в районе 11-й нед созревания плода, сначала исключительно в печени, в течение последующих 10 нед — в легких и селезенке [63], а аллерген-специфический IgE определяется у плода в середине или конце 2-го триместра беременности [69] (таблица).

К сожалению, такие эпидемиологические исследования до настоящего времени не проводились. Ближе всего к обсуждаемому вопросу, по структуре и плану проведения исследования, могла бы быть недавно выполненная объемная работа с хорошей проработкой и учетом всех необходимых показателей [70]. Однако авторы ее преследовали иную цель, а именно установление связи раннего (около 11-й недели) периода вынашивания плода, приходившегося на сезон пыления высокоаллергенных для региона лиственных деревьев (березы и ольхи), с развитием в последующем сенсибилизации к пищевым аллергенам. Причем, в работе

нет сведений ни о пыльцевой аллергии, ни о видах пищевых аллергенов, которые имеют перекрестные антигенные свойства с аллергенами пыльцы указанных видов деревьев. Поэтому упомянутая работа может быть использована лишь для создания варианта модели желаемого исследования.

Необходимые исследования, способствующие пониманию биологического смысла аллергии

Весь приведенный выше материал претендует лишь на краткое обоснование важности выбора приоритетных перспективных научных направлений, ориентированных на выяснение смысла биологической функции аллергической реактивности. Среди этих направлений интересными, по крайней мере, на сегодня представляются следующие.

Во-первых, проведение полноценных систематических исследований в рамках сравнительной аллергологии и иммунологии с целью прояснения действительной картины эволюционного хода развития аллергической реактивности.

Во-вторых, выяснение разнообразия форм изменения барьерной проницаемости и проводимости аллергенов применительно к разным типам барьерных тканей для обоснования важности патологии барьеров в предрасположении к аллергии и создания специализированных способов восстановления или замещения утраченной барьерной функции.

В-третьих, проведение исследований, направленных на выяснение биологических и медицинских последствий радикального устранения аллергической реактивности у высоко развитых животных, в том числе и у приматов. При этом нельзя исключить, что последствия утраты аллергической реактивности могут проявиться лишь в потомстве следующих поколений.

В-четвертых, установление значения режимов естественного аллергенного воздействия в антенатальном и постнатальном периодах для формирования либо устойчивости, либо, напротив, — повышенной чувствительности к аллергии.

Хочется надеяться, что такого рода исследования позволят по-новому оценить богатейший фактический материал последних десятилетий и наметить новые пути преодоления роста распространенности аллергических заболеваний.

Список литературы

1. *Igea J.M.* The history of the idea of allergy. *Allergy*. 2013. — Vol. 68. — P. 966-973.
2. *Гущин И.С., Курбачева О.М.* Аллергия и аллерген-специфическая иммунотерапия. — М.: Фармарус Принт, 2010. — 228 с.
3. *Burton O.T., Oettgen H.C.* Beyond immediate hypersensitivity: evolving roles for IgE antibodies in immune ho-

meostasis and allergic diseases. *Immunol. Rev.* 2011. — Vol. 24. — P. 128-143.

4. **Agrawal D.K., Shao Z.** Pathogenesis of allergic airway inflammation. *Cur. Allergy Asthma Rep.* 2010. — Vol. 10. — P. 39-48.

5. **Wu L.C.** Immunoglobulin E receptor signaling and asthma. *J. Biol. Chemistry.* 2011. — Vol. 23. — P. 32891-32897.

6. **Saito H., Ishizaka T., Ishizaka K.** Mast cells and IgE: from history to today. *Allergology International.* 2013. — Vol. 62. — P. 3-12.

7. **Гущин И.С.** Об элементах биологической целесообразности аллергической реактивности. *Пат. физиол.* 1979, №4, с.3-11.

8. **Супотинин Н.Н.** Эволюция аллергических процессов. *Физиол. журнал (Киев).* 1972, т.18, №6, с.837-841.

9. **Caraballo L., Zakzuk J.** Consideraciones sobre la evolucion de la respuesta inmunitaria Th2 y sus posibles relaciones con parasitosis y alergia. *Biomedica.* 2012. — Vol. 32. — P. 145-157.

10. **Gershwin L.J.** The phylogenetic development of anaphylactic activity and homocytotropic antibodies. *Dev. Comp. Immunol.* 1978. — Vol. 2. — P. 595-615.

11. **Ramsdell S.G.** A note on anaphylactic behavior in the paramecium. *J. Immunol.* 1927. — Vol. 14. — P. 197-199.

12. **Ramsdell S.G.** The smooth muscle reaction in the serum treated earthworm. *J. Immunol.* 1927. — Vol. 13. — P. 385-387.

13. **Krafka J.** The production of anaphylaxis in the crawfish. *Am. J. Epidemiol.* 1929. — Vol. 10. — P. 261-264.

14. **Dreyer N.B., King J.M.** Anaphylaxis in the fish. *J. Immunol.* 1948. — Vol. 60. — P. 277-282.

15. **Cohen S.G., Sapp T.M., Shaskas J.R.** Phylogeny of hypersensitivity. I. Anaphylactic responsiveness of the frog, *Rana pipiens*. *J. Allergy.* 1971. — Vol. 47. — P. 121-130.

16. **Downs C.M.** Anaphylaxis. VII. Active anaphylaxis in turtles. *J. Immunol.* 1928. — Vol. 15. — P. 77-81.

17. **Jayaraman S., Muthukkaruppan V.** Manifestation of anaphylaxis to egg albumen in the lizard, *Calotes versicolor*. *Experientia.* 1975. — Vol. 31 (12). — P. 1468-1469.

18. **Chand N., Eyre P.** Acute systemic anaphylaxis in adult domestic fowl — possible role of vasoactive lipids and peptides. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1978. — Vol. 236. — P. 164-176.

19. **Ettinger A.C., Hirata A.A., Van Alten P.J.** Differential susceptibilities of young and adult chickens to passive cutaneous anaphylactic reaction. *Immunology.* 1970. — Vol. 19. — P. 257-266.

20. **Faith R.E., Clem L.W.** Passive cutaneous anaphylaxis in the chicken. Biological fractionation of the mediating antibody population. *Immunology.* 1973. — Vol. 25. — P. 151-164.

21. **Bellavia A., Marino V., Gallo E.** Et al. Contact sensitivity to oxazolone in the chicken: evidence for Arthus type hypersensitivity of the cutaneous reaction. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 1992. — Vol. 14. — P. 233-250.

22. **Chand N., Eyre P.** The pharmacology of anaphylaxis in the chicken intestine. *Br. J. Pharmacol.* 1976. — Vol. 57. — P. 399-408.

23. **Chand N., Eyre P.** Anaphylactic contraction of pulmonary blood vessels of chicken. *Br. J. Pharmacol.* 1977. — Vol. 59. — P. 201-208.

24. **Wilson A.B., Heller E.D.** Passive sensitization of tissue cells. V. The detection of chicken antibodies cytophilic for basophils and eosinophils. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1976. — Vol. 51. — P. 68-79.

25. **Гущин И.С.** Немедленная аллергия клетки. М., «Медицина». 1976, 175 с.

26. **Frajnik M.F.** Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents. *Nat. Rev. Immunol.* 2002. — Vol. 2. — P. 688-698.

27. **Warr G.W., Magor K.E., Higgins D.A.** *Immunol. Today.* 1995. — Vol. 16. — P. 392-398.

28. **Lundqvist M.L., Middleton D.L., Radford C.** et al. Immunoglobulins of the non-galliform birds: antibody expression and repertoire in the duck. *Dev. Comp. Immunol.* 2006. — Vol. 30. — P. 93-100.

29. **Baghian A., Reyes C.V., Mendoza A.** et al. Production of a rabbit anti-cockatiel immunoglobulin G and characterization of its cross-reactivities with immunoglobulin G of other psittacine species. *Avian Dis.* 1999. — Vol. 43. — P. 48-54.

30. **Cadman H.F., Kelly P.J., Dikanifura M.** et al. Isolation and characterization of serum immunoglobulin classes of the ostrich (*Struthio camelus*). *Avian Dis.* 1994. — Vol. 38. — P. 616-620.

31. **Taylor A.I., Sutton B.J., Calvert R.A.** Mutations in an avian IgY-Fc fragment reveal the locations of monocyte Fc receptor binding sites. *Dev. Comp. Immunol.* 2010. — Vol. 34. — P. 97-101.

32. **Parvari R., Avivi A., Lentner F.** et al. Chicken immunoglobulin γ -heavy chains: limited VH gene repertoire, combinatorial diversification by D gene segments and evolution of the heavy chain locus. *EMBO J.* 1988. — Vol. 7. — P. 739-744.

33. **Vernersson M., Aveskogh M., Munday B., Hellman L.** Evidence for an early appearance of modern post-switch immunoglobulin isotypes in mammalian evolution (II): cloning of IgE, IgG1 and IgG2 from a monotreme, the duck-billed platypus, *Ornithorhynchus anatinus*. *Eur. J. Immunol.* 2002. — Vol. 32. — P. 2145-2155.

34. **Taylor A.I., Gould H.J., Sutton B.J., Calvert R.A.** Avian IgY binds to monocyte receptor with IgG-like structure. *J. Biol. Chem.* 2008. — Vol. 283. — P. 16384-16390.

35. **Fellah J.S., Kerfourn F., Wiles M.V.** et al. Phylogeny of immunoglobulin heavy chain isotypes: structure of the constant region of *Ambystoma mexicanum* ϵ chain deduced from cDNA sequence. *Immunogenetics.* 1993. — Vol. 38. — P. 311-317.

36. **Рахматуллин И.М.** К механизму действия сывороточных антигенов на центральную нервную систему: Дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — Казань, 1953.

37. **Viertlboeck B.C., Schweinsberg S., Hanczaruk M.A.** et al. The chicken leukocyte receptor complex encodes a primordial, activating, high-affinity IgY Fc receptor. *PNAS.* 2007. — Vol. 104. — P. 11718-11723.

38. **Arnon T.I., Kaiser J.T., West A.P.** et al. The crystal structure of CHIR-AB1, a primordial avian classical Fc receptor. *J. Mol. Biol.* 2008. — Vol. 381. — P. 1012-1024.

39. **Taylor A.I., Beavil R.L., Sutton B.J., Calvert R.A.** A monomeric chicken IgY receptor binds IgY with 2:1 stoichiometry. *J. Biol. Chem.* 2009. — Vol. 284. — P. 24168-24175.

40. **Purzel J., Schmitt R., Viertlboeck B.C., Gobel T.W.** Chicken IgY binds its receptor at C_H3/C_H4 interface similarly as the human IgA: Fc α RI interaction. *J. Immunol.* 2009. — Vol. 183. — P. 4554-4559.

41. **Windau K., Viertlboeck B.C., Gobel T.W.** The turkey Ig-like receptor family: identification, expression and function. *PLOS ONE.* 2013. — Vol. 8, e59577.

42. **Свурцков В.В.** Гомоцитотропные антитела и пассивная кожная анафилаксия у мышей разных линий: Дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — М., 1977. — 142 с.

43. *Finkelman F.D., Rothenberg M.E., Brandt E.B.* et al. Molecular mechanisms of anaphylaxis: lessons from studies with murine models. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005. — Vol. 115. — P. 449-457.
44. *Гущин И.С.* Аллергическая проницаемость барьерных тканей — стратегическая проблема аллергологии. *Пульмонология.* 2006, №3, с.5-13.
45. *Гущин И.С.* Эпидермальный барьер и аллергия. *Рос. аллергол. журн.* 2007, №2, с.3-16.
46. *Гущин И.С.* Преодоление аллергенами тканевого барьера — решающая форма предрасположения к аллергии. *Пат. физиол.* 2009, №9, с.8-13.
47. *Renkonen J., Mattila P., Lehti S.* et al. Birch pollen allergen Bet v 1 binds to and is transported through conjunctival epithelium in allergic patients. *Allergy.* 2009. — Vol. 64. — P. 868-875.
48. *Post S., Nawijn M.C., Jonker M.R.* et al. House dust mite-induced calcium signaling instigates epithelial barrier dysfunction and CCL20 production. *Allergy.* 2013. — Vol. 68. — P. 1117-1125.
49. *Eyrich K., Novak N.* Immunology of atopic eczema: overcoming the Th1/Th2 paradigm. *Allergy.* 2013. — Vol. 68. — P. 974-982.
50. *Zhou J.S., Sandomenico A., Severino V.* et al. An IgE receptor mimetic peptide (PepE) protects mice from IgE mediated anaphylaxis. *Mol Biosyst.* — 2013. — Vol. 11. — P. 2853-2859.
51. *Oettgen H.C., Martin T.R., Wynshaw-Boris A.* et al. Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. *Nature.* 1994. — Vol. 370. — P. 367-370.
52. *Arimura A., Nagata M., Watanabe A.* et al. Production of active and passive anaphylactic shock in WBB6F1 mouse, a mast cell-deficient strain. *Experientia.* 1990. — Vol. 46. — P. 739-742.
53. *Choi I.H., Shin Y.M., Park J.S.* et al. Immunoglobulin E-dependent active fatal anaphylaxis in mast cell-deficient mice. *J. Exp. Med.* 1998. — Vol. 188. — P. 1587-1592.
54. *Dombrowicz D., Flamand V., Miyajima I.* et al. Absence of Fc_εRI α chain results in upregulation of Fc_γRIII-dependent mast cell degranulation and anaphylaxis. Evidence of competition between Fc_εRI and Fc_γRIII for limiting amounts of FcR β and γ chains. *J. Clin. Invest.* 1997. — Vol. 99. — P. 915-925.
55. *Гущин И.С., Чумаева В.Г.* Аллергия к насекомым. Клиника, диагностика и лечение. М., «Фармарус Принт», 2003, 328 с.
56. *Meiler F., Zumkehr J., Klunber S.* et al. In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. *J. Exp. Med.* 2008. — Vol. 205. — P. 2887-2898.
57. *Holloway J.A., Warner J.O., Vance G.H.* et al. Detection of house-dust-mite allergen in amniotic fluid and umbilical-cord blood. *Lancet.* 2000. — Vol. 356. — P. 1900-1902.
58. *Szepfalusi Z., Pichler J., Elsasser S.* et al. Transplacental priming of the human immune system with environmental allergens can occur early in gestation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000. — Vol. 106. — P. 530-536.
59. *Fusaro A.E., de Brito C.A., Tanigushi E.F.* et al. Balance between early life tolerance and sensitization in allergy: dependence on the timing and intensity of prenatal and postnatal allergen exposure of the mother. *Immunology.* 2009. — Vol. 128. — P. e541-e550.
60. *Uthoff H., Spenner A., Reckelkamm W.* et al. Critical role of preconceptional immunization for protective and nonpathological specific immunity in murine neonates. *J. Immunol.* 2003. — Vol. 71. — P. 3485-3492.
61. *Polte T., Hennig C., Hansen G.* Allergy prevention starts before conception: maternofetal transfer of tolerance protects against the development of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008. — Vol. 122. — P. 1022-1030.
62. *Jones C.A., Holloway J.A., Warner J.O.* Does atopic disease start in foetal life? *Allergy.* 2000. — Vol. 55. — P. 2-10.
63. *Jones C.A., Holloway J.A., Warner J.O.* Fetal immune responsiveness and routes of allergic sensitization. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2002. — Vol. 13 (Suppl.15) p.19-22.
64. *Barret E.G.* Maternal influence in the transmission of asthma susceptibility. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2008. — Vol. 21. — P. 474-484.
65. *Bufford J.D., Reardon C.L., Roberg K.A.* et al. Effects of dog ownership in early childhood on immune development and atopic diseases. *Clin. Exp. Allergy.* 2008. — Vol. 38. — P. 1635-1643.
66. *Lombardi E., Simoni M., La Grutta S.* et al. Effects of pet exposure in the first year of life on respiratory and allergic symptoms in 7-yr-old children. The SIDRIA-2 study. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2010. — Vol. 21. — P. 268-276.
67. *Nilsson L., Bjorksten B., Hattevig G.* et al. Season of birth as predictor of atopic manifestations. *Arch. Dis. Childhood.* 1997. — Vol. 76. — P. 341-344.
68. *Knudsen T.B., Thomsen S.F., Ulrik C.S.* et al. Season of birth and risk of atopic disease among children and adolescents. *J. Asthma.* 2007. — Vol. 44. — P. 257-260.
69. *Hertz-Picciotto I., Park H.Y., Dostal M.* et al. Prenatal exposures to persistent and non-persistent organic compounds and effects on immune system development. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2008. — Vol. 102. — P. 146-154.
70. *Pyrhonen K., Laara E., Hiltunen L.* et al. Season of the first trimester of pregnancy predicts sensitisation to food allergens in childhood: a population-based cohort study from Finland. *J. Epidemiol. Community Health.* 2012. — Vol. 66. — P. 49-56.

Поступила 30.01.14

Сведения об авторах:

Игорь Сергеевич Гущин — д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАМН, зав. отделом клинической иммунологии и аллергологии

М.Л. Кукушкин, С.И. Игонькина

Значение ГАМК в патогенезе болевых синдромов

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

Представлены данные о структурно-функциональной организации ГАМКергической системы мозга и роли тормозного нейромедиатора ГАМК в механизмах развития патологической боли.

Ключевые слова: ГАМК, ГАМК рецепторы, ГАМКергическая система мозга, ГАМКергическое торможение, ноцицептивная система, антиноцицептивная система, болевые синдромы, фармакотерапия

M.L. Kukushkin, S.I. Igonkina

Significance of GABA in pain syndrome pathogenesis

Institute of Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

The article presents a data on structural and functional organization of GABA-ergic system of brain and the role of GABA in mechanisms of the pathological pain.

Key words: GABA, GABA-ergic system of brain, GABA-ergic inhibition, nociceptive system, antinociceptive system, pain syndrome, pathological pain, drug therapy

Нейромедиатор гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) — основной тормозный нейромедиатор в ЦНС — поддерживает баланс тормозных и возбуждающих процессов в нейронах ЦНС. Нарушение этого баланса в системе болевой чувствительности является основой развития центральной сенситизации ноцицептивных нейронов — ключевого фактора в патогенезе патологической боли, представленной в клинике многочисленными невропатическими, ноцицептивными, дисфункциональными и смешанными формами болевых синдромов [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12].

Изучение нейромедиатора ГАМК при патологических состояниях организма показало, что с патологической болью ассоциируется его гипofункция [2, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24].

Локализация тормозного нейромедиатора ГАМК в системе болевой чувствительности в ЦНС

Наличие ГАМК в организме млекопитающих было открыто в 1950 г. независимо тремя группами исследователей [25, 26, 27]. Удивительным в этих работах оказалось то, что ГАМК содержится исключительно в структурах ЦНС, в других тканях млекопитающих эта аминокислота или отсутствовала, или имела в виде следов. Содержание ГАМК в мозге в процессе эмбриогенеза растет постепенно: между 15-м и 19-м днями онтогенеза происходит скачкообразное в 2—4 раза увеличение концентрации и к мо-

менту рождения достигает 60% от уровня взрослого мозга.

Установлено, что 30-40% всех нейронов ЦНС используют ГАМК как основной нейромедиатор [28]. Одно время считалось, что на уровне спинного мозга преимущественно действует тормозный нейромедиатор глицин, но в дальнейшем было подтверждено, что и на сегментарном уровне ГАМК также играет роль основного тормозного нейромедиатора [29]. Концентрация нейромедиатора ГАМК в ЦНС значительно превосходит величину, характерную для других нейромедиаторов. Не менее 30% синаптических контактов мозга имеют ГАМКергическую природу, в то время как на долю дофаминергических окончаний приходится 15%, на долю холинергических синапсов не более 10%, только 5% нервных окончаний являются норадренергическими и менее 5% серотонинергическими [30].

В спинальных и супраспинальных структурах ноцицептивной системы в ЦНС, где происходит реализация, проведение, обработка и контроль нейрональной импульсации при боли, отмечается высокое содержание нейромедиатора ГАМК и его рецепторов. Тормозный нейромедиатор ГАМК выявлен на всех уровнях ноцицептивной системы: в дорсальных рогах спинного мозга, в околowodопроводном сером веществе, ядрах шва, ретикулярной формации, таламусе, передней части инсулярной коры, амигдале, добавочном ядре [31, 32, 33, 34, 35, 36].

В работе Curtis D.R. и G.A.R Johnston [37] представлены данные о содержании в микромолях ГАМК в структурах ЦНС: 2,1-2,2 — в задних рогах спинного мозга (серое вещество), 0,4 в задних рогах спинного мозга (белое вещество), 1,0-1,3 в вентральных рогах спинного мозга (серое вещество), 0,3-0,4 в вентральных рогах спинного мозга (белое вещество), 1,6 — в продолговатом мозге, 3,6 — в среднем мозге, 2,1-4,5 — в таламусе, 1,4 — в коре головного мозга.

Хотя ГАМК функционирует в ЦНС как тормозный медиатор, в некоторых ситуациях наблюдается нетипичное функционирование ГАМКергической системы. Например, на ранних этапах развития мозга, включающих эмбриональный период и первые две недели после рождения, ГАМК играет роль медиатора возбуждения, что связано с отсутствием в незрелых нейронах котранспортера KCC2 и высоким уровнем экспрессии $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ котранспортера NKCC1 [38, 39]. Однако для нейрональных структур системы болевой чувствительности наиболее типичным действием ГАМК будет тормозное.

Синтез и метаболизм нейромедиатора ГАМК в ЦНС

Механизм синтеза и метаболизма ГАМК сложен. Непосредственным предшественником ГАМК в ЦНС является глутамат, ГАМК образуется при декарбоксилировании глутамата под действием глутаматдекарбоксилазы (glutamic acid decarboxylase — GAD).



L-глутаминовая кислота



ГАМК

Фермент GAD найден только в ЦНС и почти исключительно в сером веществе [40]. Реакция осуществляется в присутствии кофермента пиридоксальфосфата (витамина В6), входящего в активный центр GAD. ГАМК из цитоплазмы переносится в синаптические везикулы пресинаптического окончания благодаря специфическому транспортеру и при деполяризации пресинаптического нервного окончания в результате кальций-зависимого экзоцитоза выделяется в синаптическую щель [41].

После взаимодействия с соответствующими ГАМК рецепторами нейромедиатор удаляется из синаптической щели посредством обратного захвата электрогенными мембранными ГАМК транспортерами, расположенными на пресинаптической нервной терминали, мембране нейронов и на мембране астроцитов.

В настоящее время известны следующие транспортеры (GAT — gamma-aminobutyric acid transporter): GAT1, GAT2, GAT3, GAT4, доминирующим для нервных клеток является транспортер GAT1 [42]. При посредстве транспортеров происходит аккумуляция ГАМК нейронами и глиальными клетками. Нейроглиальные клетки способны наряду с активным потреблением ГАМК из окружающей среды активно ее синтезировать.

Другой путь инактивации ГАМК происходит за счет метаболической деградации в реакции трансаминирования с α -кетоглутаратом под действием митохондриальной ГАМК-трансаминазы. Инактивация ГАМК возможна и окислительным путем под действием моноаминоксидаза.

Кроме медиаторной, ГАМК осуществляет в организме и метаболическую функцию. ГАМК принимает участие в обменных процессах, протекающих в мозге, являясь одним из промежуточных продуктов «шунта Робертса», или «шунта ГАМК», тесно связанного с циклом трикарбоновых кислот и влияющего на транспорт и утилизацию глюкозы, окислительное фосфорилирование, обмен белков [30].

ГАМК в формировании болевых синдромов

При болевых синдромах происходит изменение в содержании ГАМК в ноцицептивной системе, и в зависимости от характера боли эти изменения имеют свои особенности. При ноцицептивной воспалительной боли у подопытных животных, повышается содержание ГАМК в I-III пластинках дорсальных рогах на стороне воспаления и, напротив, при невропатической боли в случае дорсальной ризотомии, повреждении спинного мозга и периферических нервов уменьшается содержание ГАМК в дорсальных рогах спинного мозга [15, 16, 17, 18, 24].

В лаборатории фундаментальных и прикладных проблем боли НИИ общей патологии и патофизиологии в опытах на крысах было установлено, что снижение ГАМКергической медиации в дорсальных рогах спинного мозга, в каудальном ядре тройничного нерва или в таламических ядрах приводит к развитию невропатической боли [13, 43], [44, 45, 46, 47, 48, 49]. В этих работах с целью создания дефицита ГАМКергического торможения в ноцицептивных структурах крысам вводили либо антитела к ГАМК, либо блокатор ГАМК_A рецепторов, либо конвульсант, тормозящий выделение ГАМК из пресинаптических окончаний. После введения блокаторов и конвульсантов в дорсальные рога спинного мозга, каудальное ядро тройничного или интраламинарное ядро таламуса у крыс развивалась невропатическая боль в виде аллодинии, аутономии и спонтанных приступов боли, локализация которых соответствовала месту действия веществ в ЦНС [43, 44, 45]. При небольшом дефиците

ГАМК_Кергического торможения возникала аллодиния, при значительном дефиците у животных, кроме аллодинии, появлялись спонтанные приступы боли и аутономия [13]. Унилатеральная аппликация крысам антител к ГАМК в зону дорсальных рогов L4-L6 сегментов спинного мозга также приводила к развитию механической аллодинии в ипсилатеральной задней конечности [48, 50]. У крыс с моделью невропатической боли, вызванной перерезкой седалищного нерва, индуцировался синтез аутоантител к ГАМК, влияющих на активность ГАМК_Кергической медиации в ноцицептивной системе [49, 50, 51]. Данные о проноцицептивном влиянии антител к тормозным нейромедиаторам свидетельствуют об иммуномодуляции ГАМК_Кергической системы и о вовлечении иммунной системы в патогенез невропатического болевого синдрома [47, 48, 49, 50, 52, 53, 54].

Блокада спинальных ГАМК рецепторов снижает пороги реакций на ноцицептивные механические и температурные стимулы у крыс [20]. Интратекальное введение антагонистов ГАМК_А рецепторов бикикуллина, пикротоксина, [55] или антагонистов ГАМК_В рецепторов CGP 35348, факлофена, [20, 89] оказывается достаточным, чтобы вызвать у животных тактильную аллодинию. Блокада ГАМК рецепторов вызывает сенситизацию нейронов ноцицептивной системы и развитие патологической боли [56, 57].

ГАМК-рецепторы

В структурах ноцицептивной системы, как и в других зонах ЦНС, основными рецепторами для нейромедиатора ГАМК являются ГАМК_А рецепторы и ГАМК_В рецепторы. Имеются еще ГАМК_С рецепторы, но вопрос о выделении ГАМК_С рецепторов в отдельный подтип остается открытым. Комитет по номенклатуре IUPHAR (International Union of Basic and Clinical Pharmacology) рекомендует считать ГАМК_С рецепторы разновидностью ГАМК_А рецепторов, нечувствительных к бикикуллину, бензодиазепинам и анестетикам. На настоящий момент остается признанным деление ГАМК рецепторов на два основных типа: ГАМК_А рецепторы и ГАМК_В рецепторы.

Первоначально были открыты ГАМК_А рецепторы [58], чувствительные к бикикуллину, а затем ГАМК_В рецепторы, нечувствительные к бикикуллину, а чувствительные к баклофену [59].

Рецепторы к ГАМК представляют белковый комплекс генетически детерминированных макромолекул, который формируется из нескольких трансмембранных субъединиц с молекулярной массой около 50 кДа. В настоящее время у млекопитающих известны следующие субъединицы ГАМК рецепторов: α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , π , σ , ρ_{1-3} [60]. Различные варианты сплайсинга РНК, например, в отношении α_5 , β_2 , и γ_2 , приводящие к возникновению изоформ, еще больше увеличивают разно-

образии этих структурных компонентов. Субъединицы β_2 , α_1 , и γ_2 , кодируемые соответственно *GABRB2*-, *GABRA1*- и *GABRG2*-генами, являются самыми распространёнными [61]. Мутации в генах, кодирующих субъединицы ГАМК рецептора, приводят к нарушению функционирования ГАМК_Кергических синапсов. Доказано, что мутация в гене *GABRG2*, кодирующем субъединицу γ_2 , приводит к развитию эпилепсии, фебрильным судорогам [62]. Комбинация субъединиц определяет чувствительность ГАМК рецептора к агонистам и модуляторам. Например, комбинация субъединиц α_1 , α_2 , и γ_2 отвечает за чувствительность к бензодиазепинам, потеря субъединицы γ_2 делает рецептор нечувствительным к бензодиазепинам и приводит к потере антиноцицептивного эффекта [63].

ГАМК_А и ГАМК_В рецепторы не только обладают разной фармакологической чувствительностью, но и существенно различаются по механизму передачи сигнала. ГАМК_А рецепторы сопряжены с потенциал-зависимым хлорным каналом и функционально обеспечивает быстрое (менее 100 мс) синаптическое торможение, ГАМК_В рецепторы при помощи вторичных мессенджеров активирует калиевый и/или кальциевый каналы и функционально участвуют в медленном (более 100 мс) тормозном ответе нейрона и в торможении экзоцитоза нейромедиатора из пресинаптического окончания [57, 64, 65, 66, 67].

Ионотропные ГАМК_А рецепторы в ноцицептивной системе

Ионотропные ГАМК_А рецепторы расположены в ЦНС как пресинаптически на афферентных окончаниях, так и потесинаптически на мембране нейронов. ГАМК_А рецепторы относятся к суперсемейству Суз-петлевых никотиноидных лиганд-зависимых ионных каналов.

Наиболее известной моделью функционирующего ГАМК_А рецептора является пентамер из двух α , двух β и одной γ субъединиц, формирующий в мембране канал для ионов [68]. В спинном мозге, как и в других структурах ЦНС, отмечается гетерогенность композиций субъединиц для ГАМК: $(\alpha_3/\beta_{2,3}/\gamma_2)$; $(\alpha_2/\beta_{2,3}/\gamma_2)$; $(\alpha_1/\beta_{2,3}/\gamma_2)$; $(\alpha_5/\beta_{2,3}/\gamma_2)$; $(\alpha_1/\alpha_5/\beta_{2,3}/\gamma_2)$; (α_2/γ_2) ; $(\alpha_2/\alpha_5/\gamma_2)$. В пластине дорсальных рогов спинного мозга, связанных с ноцицепцией, преобладают субъединицы α_2 , α_3 , β_2 , β_3 , γ_2 [29]. Все три субъединицы ГАМК_А рецепторов (α , β и γ) связывают ГАМК, хотя наиболее высокая аффинность связывания отмечается с α -субъединицей.

Нейромедиатор ГАМК, связываясь с ионотропным рецептором ГАМК_А, меняет конфигурацию рецептора так, что открывается канал, избирательно проницаемый для отрицательно заряженных ионов хлора. В небольшом количестве через хлорный канал могут проходить

также анионы бикарбоната (HCO_3^-) [69]. За счет входа ионов хлора в нейрон повышается трансмембранный потенциал нейрона и развивается гиперполяризация, формирующая тормозный постсинаптический потенциал (ТПСП), который и вызывает снижение активности нейрона. Торможение нейрона, вызванное нейромедиатором ГАМК, может быть фазическим или тоническим. Фазическое торможение нейронов обусловлено дискретным выбросом из пресинаптических окончаний высоких концентраций ГАМК в синаптическую щель и действием нейромедиатора непосредственно на постсинаптические ГАМК_A рецепторы в зоне высвобождения ГАМК [28]. Тоническое ГАМКергическое торможение в ЦНС генерируется действием ГАМК не в области синапса, а воздействием на экстраинаптические рецепторы [70]. Тоническое торможение нейрона возникает за счет постоянной активации ГАМКергических экстраинаптических рецепторов в результате растекания ГАМК за пределы синаптической щели, экзоцитоза ГАМК астроцитами, работы транспортеров.

Следует также учитывать, что на конечный результат влияет, какой нейрон в ЦНС тормозится: если ГАМКергическому торможению подвергаются тормозные ГАМКергические вставочные нейроны, то конечным результатом будет растормаживание последующего нейрона. Например, при локальном введении агонистов ГАМК_A рецепторов в ростральный отдел продолговатого мозга, осуществляющего нисходящее торможение ноцицептивных нейронов дорсального рога, ноцицептивная передача будет подавляться, а увеличиваться в результате торможения нисходящего тормозного пути [71]. Однако для систем, осуществляющих регуляцию болевой чувствительности, наиболее типичным действием ГАМК будет антиноцицептивное [20, 22, 35, 72].

ГАМК_A рецепторы обладают очень интересной особенностью, они имеют аллостерические сайты для связывания с бензодиазепинами, барбитуратами, нейростероидами, этанолом и цинком, которые модулируют активность хлорного канала [73, 74, 75]. В литературе эту композицию ГАМК_A рецептора называют ГАМК-барбитурат-бензодиазепин-рецепторным комплексом.

Бензодиазепины, связываясь с сайтами, расположенными на поверхности $\alpha/\gamma 2$ субъединиц ГАМК_A рецептора, увеличивают аффинность ГАМКергического рецептора к агонисту. Бензодиазепины обуславливают усиление активности ГАМК_A рецептора лишь при наличии $\gamma 2$ -субъединицы в составе ГАМК_A-рецептора [76].

Барбитураты увеличивают время открытого состояния и проводимость хлорных каналов ГАМКергического рецептора. ГАМК_A рецепторов, чувствитель-

ных к барбитуратам, в мозге больше, чем чувствительных к бензодиазепинам [74].

Когда с ГАМК_A рецепторами связываются нейростероиды (прогестерон, тестостерон, дезоксикортикостерон и др.), происходит изменение длительности и частоты открытия хлорных каналов [77]. Аффинность связывания каждого из модуляторов повышается, если они одновременно взаимодействуют с ГАМК_A рецептором

ГАМК_A рецепторы играют важную роль в механизмах боли, и нарушение их активности вносит существенный вклад в развитие болевых синдромов. Блокада хлорных каналов в спинном мозге вызывает центральную сенситизацию и развитие патологической боли [2, 18, 56, 57].

Активация ГАМК_A рецепторов оказывает антиноцицептивное влияние. Спинальная аппликация агониста ГАМК_A рецепторов мусцимола крысам с невропатической болью превращает длительную посттетаническую потенциацию ноцицептивных нейронов в дорсальных рогах, которая развивается у крыс после повреждения нерва [22]. Активация ГАМК_A рецепторов в парафасциальном комплексе таламуса вызывает антиноцицептивный эффект [78]. Повышение ГАМКергической активности в передней инсулярной коре увеличивает нисходящее торможение ноцицептивных нейронов и вызывает анальгезию [79]. В специальных исследованиях была выявлена связь между проявлением антиноцицептивного эффекта и наличием субъединицы $\rho 1$ в структуре ГАМК_A рецептора дорсальных рогов [80].

Метаботропные ГАМК_B рецепторы в ноцицептивной системе

Первоначально метаботропные ГАМК_B рецепторы были выявлены в периферической нервной системе. В 1979 г. N.G. Bowerly и A.I. Hudson [59] описали нечувствительное к бикикуллину тормозное влияние ГАМК на выделение норадреналина в периферической нервной системе, затем исследования были сфокусированы на изучении метаботропных ГАМК_B рецепторов в ЦНС [31, 81, 82, 83, 84, 85].

ГАМК_B рецепторы относятся к суперсемейству G-белок связанных рецепторов (GPCR — G protein-coupled receptor) [66].

Функционирующие метаботропные ГАМК_B рецепторы состоят из двух субъединиц: субъединицы R1 (ГАМК_{B1}) и субъединицы R2 (ГАМК_{B2}), с субъединицей ГАМК_{B1} связывается нейромедиатор ГАМК, а с субъединицей ГАМК_{B2} связываются модуляторы [82, 85]. Метаботропные ГАМК_B рецепторы в ЦНС расположены как пре-, так и постсинаптически [66, 82, 83]. В ноцицептивной системе ГАМК_B рецепторы локализованы в дорсальных рогах спинного мозга, в среднем и продолговатом мозге,

в ядрах шва, таламусе, в коре, в структурах лимбико-ретикулярного комплекса [33, 34, 35].

Механизм действия метаботропных рецепторов отличается от функционирования ионотропных ГАМК_А рецепторов. После соединения нейромедиатора ГАМК с ГАМК_В рецептором активируется каскад специфических реакций. В результате очень слабый сигнал, создаваемый взаимодействием нейромедиатора с рецептором, усиливается в несколько тысяч раз.

Благодаря активации ГАМК_В рецепторов осуществляется регулирование нескольких комплексных процессов внутри нейрона. Субъединица ГАМК_В через комплексы G-белков (G α , G β , G γ) активирует три пути передачи сигнала, [31, 66, 83, 84]. Первый путь: ГАМК_В рецепторы через G $\beta\gamma$ -белок взаимодействуют с N- и P/Q- потенциал-зависимыми кальциевыми каналами, уменьшая поступления ионов кальция через кальциевые каналы нейрональной мембраны [83, 84, 86]. Уменьшение поступления ионов кальция в пресинаптическое окончание подавляет выброс нейромедиатора в синаптическую щель. Второй путь: ГАМК_В рецепторы через G $\beta\gamma$ -белок открывают калиевые G-белок сопряженные каналы (GIRK — G protein-gated inward rectifying K⁺ channels) [83, 87]. Благодаря активации данных каналов увеличивается выход из клетки ионов калия и возникают медленные ТПСП, длящиеся сотни миллисекунд. Третий путь: ГАМК_В рецепторы, связанные с G α -белками, активируют аденилатциклазу и в зависимости от типа аденилатциклазы в клетке и присутствия или отсутствия субъединицы G α s вызывают увеличение либо уменьшение образования циклического 3',5'-аденозинмонофосфата (цАМФ) из АТФ [83].

Процесс торможения нейронов, вызванный активацией ГАМК_В рецепторов, является более длительным, чем торможение нейрона, вызванное активацией ГАМК_А. Поскольку процесс многоступенчатый, требующий активации G-белков, то торможение возникает с большой задержкой (20-50 мс), медленной начальной фазой (400 мс) и медленной фазой затухания (13000 мс) [70]. Благодаря длительной активации калиевых каналов возникает долговременная депрессия (Long-term depression- LTD) нейронов. LTD вместе с долговременной потенциацией (Long-term potentiation — LTP) лежат в основе пластических изменений в сенсорных системах. Для системы болевой чувствительности эти пластические процессы в ноцицептивной системе важны в плане формирования памяти боли, развития хронической боли.

Активация ГАМК_В рецепторов, локализованных на возбуждающих афферентных окончаниях, подавляет вход ионов кальция в синаптическую терминаль и предотвращает высвобождение нейромедиатора из терминали, поэтому нейрон не активируется [83, 84].

Активация ГАМК_В рецепторов, расположенных постсинаптически, увеличивает проводимость ионов К, что приводит к гиперполяризации клетки [35].

Для регуляции ноцицепции представляет интерес пре- и постсинаптическая локализация ГАМК_В рецепторов на входе ноцицептивной импульсации в спинной мозг, где осуществляется первичная обработка сигналов и где возможны изменения нейрональной активности (сенситизация, пластичность, гибель нейронов и т.д.), приводящие к развитию патологической боли. В дорсальных рогах спинного мозга ГАМК_В рецепторы контролируют активность ноцицептивных нейронов через два механизма: пресинаптически за счет снижения секреции возбуждающих нейромедиаторов (глутамат, субстанция Р) из С- и А δ - ноцицептивных волокон [86], и постсинаптически за счет гиперполяризации ноцицептивных нейронов в I-III пластинках дорсальных рогов [87].

Влияние ГАМК_В рецепторов на болевую чувствительность продемонстрировано в экспериментальных исследованиях с помощью агонистов и антагонистов. Показано, что интратекальное введение антагониста ГАМК_В рецепторов CGP35348 или факлофена вызывает у крыс аллодинию и тепловую гипералгезию [20, 88], Селективный агонист ГАМК_В рецепторов баклофен, введенный интратекально, проявляет антиноцицептивный эффект в тесте Tail-flick у нормальных крыс и увеличивает латентный период на ноцицептивное термическое раздражение у крыс с перерезкой нерва [20]. В опытах на модели ишемического повреждения спинного мозга установлено, что баклофен в низких дозах подавляет аллодинию и реверсирует гиперактивность интернейронов дорсального рога на механическую стимуляцию [10, 89]. Гипералгезию демонстрируют ГАМК_{В1} нокаутные мыши и ГАМК_{В2} нокаутные мыши [19].

ГАМК_С рецепторы в ноцицептивной системе

В литературе имеются сообщения о наличии у позвоночных ГАМК_С рецепторов, отличающихся от ГАМК_А и ГАМК_В рецепторов по нечувствительности к биксукуллину и баклофену, которые блокируются цис-аминокротоновой кислотой. Эти рецепторы, названные ГАМК_С рецепторами и в настоящее время выделяемые как подтип ГАМК_А, формируют хлорный канал в мембране нейрональных образований. ГАМК_С рецепторы считаются филогенетически самым старым типом и состоят только из ρ -субъединиц. ГАМК_С рецепторы представлены в биполярных клетках сетчатки, а также в ряде нейронов в стволе мозга, гиппокампе, в спинном мозге [67].

В ноцицептивной системе ρ -субъединицы локализованы в I-II пластинках дорсального рога и спинномозговых ганглиях и могут образовывать гибриды

с $\gamma 2$ субъединицами ГАМК_A рецепторов, и эти ансамбли оказываются чувствительным к бензодиазепинам [90]. Показано, что дефицит экспрессии ρ -субъединиц у нокаутных мышей приводит к гипералгии [90].

Антиноцицептивное влияние агонистов ГАМК_A рецепторов

Агонисты ГАМК_A рецепторов и их аллостерические модуляторы проявляют анальгетическое влияние как на ноцицептивную, так и на невропатическую боль [20, 91, 92, 93, 94], но наиболее чувствительной к антиноцицептивному эффекту агонистов ГАМК_A рецепторов оказалась невропатическая боль. Ноцицептивная боль у животных, вызванная воспалением, подавляется мусцимолом и изогувацином только в течение поздней фазы [91, 92]. При невропатической боли агонисты ГАМК_A рецепторов эффективны уже в ранний период развития болевого синдрома. В исследовании M.J. Eaton с соавторами [95] показано, что тепловая гипералгия и механическая аллодиния у крыс с невропатической болью реверсируются, если нейромедиатор вводится в течение первых двух недель развития болевого синдрома.

Данные литературы свидетельствуют о том, что обезболивающий эффект, вызванный действием аллостерических модуляторов — бензодиазепинов и барбитуратов — на ГАМК_A-барбитурат-бензодиазепин-рецепторный комплекс, реализуется на уровне спинного мозга. Бензодиазепины более эффективны в подавлении боли при интратекальном введении по сравнению с системным и интравентрикулярным введением [96]. Обезболивающее действие барбитуратов наблюдается при интратекальном введении, в то время как их интрацеребровентрикулярное введение приводит к развитию гипералгии [97].

Большую роль в механизмах анальгетического эффекта агонистов ГАМК рецепторов играет их взаимосвязь с другими антиноцицептивными нейромедиаторными системами, в частности, реципрокные отношения с опиоидной антиноцицептивной системой. Микроинъекция агониста мусцимола в околоспинальное серое вещество блокирует вызванное опиоидом обезболивание [98], и, напротив, введение в этот район антагониста ГАМК_A рецепторов пикротоксина увеличивает анальгетический эффект опиоидов [99]. Электростимуляция или микроинъекция в околоспинальное серое вещество и дорсальное ядро шва столбнячного токсина, блокирующего высвобождение ГАМК, вызывают анальгезию физиологической и патологической боли [13, 100, 101]. В этих исследованиях показано, что центральная невропатическая боль не развивается, если введение столбнячного токсина в супраспинальные структуры антиноцицептивной системы происходит за

4—8 часов до моделирования невропатической боли центрального происхождения. Это объясняется тем, что ГАМК_A рецепторы в этом районе ЦНС тонически тормозят нейроны, проецирующие антиноцицептивные нисходящие тормозные пути в спинной мозг, и поэтому предварительное снижение ГАМКергического тонического торможения вызывает эффект растормаживания антиноцицептивной структуры. Супраспинальные ГАМК_A рецепторы подобным образом действуют и в отношении других нисходящих антиноцицептивных систем: серотонинергической и норадренергической. Микроинъекция мусцимола в околоспинальное серое вещество уменьшает антиноцицептивный эффект клонидина [102].

Антиноцицептивное влияние агонистов ГАМК_B рецепторов

В экспериментальных исследованиях показано, что агонист ГАМК_B рецепторов баклофен подавляет как ноцицептивную боль у крыс при системном и интратекальном введении [91, 103], так и невропатическую боль при интратекальном, интрацеребровентрикулярном, интраперитонеальном и подкожном введении [93, 104, 105].

Интрацеребровентрикулярное введение антагониста ГАМК_B рецепторов CGP 35348 блокирует антиноцицептивное действие антидепрессантов, используемых для лечения невропатической боли [106].

ГАМК_B рецепторы могут влиять на боль совместно с ГАМК_A рецепторами. Инактивация экспрессии $\beta 3$ субъединицы ГАМК_A рецепторов не только уменьшает болевой порог и антиноцицептивный эффект агониста ГАМК_A рецепторов, но и снижает антиноцицептивный эффект агониста ГАМК_B рецепторов баклофена [107].

Антиноцицептивное влияние агонистов ГАМК_B рецепторов зависит от дозы и места введения. Микроинъекции низких доз баклофена в дорсальное ядро шва и ретикулярное гигантоклеточное ядро увеличивает латентный период болевой реакции в тесте Tail Flick, а аналогичное введение высоких доз уменьшает латентный период [108]. Экспериментально также доказано, что анальгезия, вызванная системным введением баклофена, блокируется селективным антагонистом ГАМК_B рецепторов CGP 35348 при интратекальном введении и не блокируется при супраспинальном введении в вентральный продолговатый мозг [109]. Эти данные свидетельствуют об особой роли спинальных ГАМК_B рецепторов в механизмах антиноцицепции.

Пластические преобразования в ГАМК_B рецепторах могут изменять функционирование ГАМК_B рецепторов и антиноцицептивный эффект вводимых препаратов [35, 72]. Например, воспалительная боль приводит к увеличению в стволе мозга количества

нейронов, содержащих ГАМК_B рецепторы и уменьшению количества ГАМК_B рецепторов в спинном мозге [110]. Пластические изменения в системе ГАМК_B рецепторов также происходят при длительном введении их агонистов [35] или антидепрессантов [72, 111].

Таким образом, на проявление антиноцицептивного эффекта агонистов ГАМК_B рецепторов влияют многие факторы: доза, способ, место и длительность введения агониста, а также вид боли и модулирующие влияния других нейромедиаторных систем.

Антиноцицептивное влияние ингибиторов метаболизма ГАМК

Одним из путей подавления болевых синдромов является использование препаратов, повышающих содержание нейромедиаторов антиноцицептивной системы. Так, в терапии невропатической боли применяют антидепрессанты, блокирующие обратный захват серотонина и норадреналина и тем самым повышающие уровень этих нейромедиаторов в антиноцицептивной системе [4, 8, 11, 112]. Этот же принцип — повышение уровня тормозного нейромедиатора в ЦНС — лежит в основе антиноцицептивного эффекта ингибиторов транспортера ГАМК и ингибиторов фермента ГАМК-трансаминазы [113, 114, 115, 116].

Показано, что специфические блокаторы обратного захвата ГАМК оказывают антиноцицептивное влияние на болевую чувствительность [8, 113, 116, 117].

В экспериментальных исследованиях показано, что системное и интратекальное введение селективных ингибиторов GAT1 транспортеров ГАМК (тиагабина, SKF 89976A, NO-711) и ингибитора фермента ГАМК-трансаминазы оказывает антиноцицептивное влияние на болевые реакции у мышей с моделями острой, воспалительной и невропатической боли. [113, 118]. В работе Zom S.H. с соавторами [113] отмечено, что блокаторы GAT1 транспортера более эффективно подавляют болевую реакцию на ноцицептивное термическое раздражение, чем агонисты ГАМК рецепторов. Интратекальное введение селективного ингибитора транспортера ГАМК — NO-711 крысам с моделью невропатической боли дозозависимо подавляет тепловую гипералгезию и тактильную аллодинию [118]. Повышение ГАМКергической активности в передней инсулярной коре с помощью ингибиторов ГАМК-трансаминазы усиливает нисходящее торможение ноцицептивных нейронов и вызывает алгезию [79].

ГАМК и фармакотерапия болевых синдромов

Несмотря на то, что роль ГАМК рецепторов в антиноцицепции доказана многочисленными исследованиями [4, 5, 17, 20, 35, 50, 119], число ГАМК-позитивных препаратов для лечения болевых синдромов в клинической

практике ограничено. Сложность использования аналогов ГАМК в медицине связана не только с рядом нежелательных побочных эффектов (толерантность, седатация и др.), но и с тем, что анальгетический эффект агонистов ГАМК рецепторов зависит от многочисленных факторов: природы, интенсивности и длительности болевого синдрома; дозы, способа и места введения препаратов; пластичности рецепторов и их сопряженности с другими нейромедиаторными системами.

Первым лекарственным средством на основе ГАМК был японский препарат гаммалон (отечественный аналог — аминалон), который и сейчас используется как ноотропное и антигипоксическое средство. Позже появился отечественный препарат фенибут (фенильное производное ГАМК: 4-амино-3-фенилбутановая кислота (буфенил), который, в отличие от гаммалона, проходит через гематоэнцефалический барьер и применяется как ноотропное и успокаивающее средство.

Пикамилон (N-никотиноил-γ-аминомасляная кислота) — препарат, полученный соединением никотиновой кислоты (витамин РР) с ГАМК, улучшает мозговое кровообращение и оказывает успокаивающее действие при тревоге, страхе, повышенной раздражительности. Пирацетам (ноотропил) (2-оксо-1-пирролидинацетамид) является циклическим аналогом ГАМК и родоначальником группы ноотропов с нейропротекторным и нейромодулирующим действием.

Для фармакотерапии боли из имеющихся структурных аналогов ГАМК и веществ, влияющих на ГАМКергическую медиацию, в практическом плане представляют интерес баклофен, габапентин, прегабалин, тиагабин, вигабатрин.

Структурные аналоги ГАМК: габапентин обладают противосудорожным и анальгетическим свойствами, являются препаратами первой линии для лечения невропатической боли [8, 112, 120]. Хотя габапентин и прегабалин являются структурными аналогами ГАМК, оказалось, что механизм анальгезии, вызванный этими антиконвульсантами, обусловлен торможением входа ионов Ca через кальциевые каналы, содержащие субъединицы $\alpha_2\delta$ [121, 122], но не селективным действием на ГАМК_B рецепторы, как это изначально предполагалось [123].

Баклофен (γ-амино-β-(p-хлорфенил)масляная кислота) — единственный селективный агонист ГАМК_B рецепторов, который широко используется в медицинской практике как центральный миорелаксант в терапии спастичности спинального и церебрального происхождения, при рассеянном склерозе, геми- и тетраплегии. В настоящее время баклофен успешно применяется как анальгетическое средство при различных типах боли. Баклофен уменьшает мышечно-скелетную боль, подавляет боли при травме спинного мозга и инсульте, при тригеминальной посттерпетической невралгии,

диабетической невропатии, мигрени, боли в спине [4, 7, 124, 125, 126, 127]. Терапевтический эффект баклофена обусловлен торможением высвобождения возбуждающих нейромедиаторов и нейропептидов в дорсальные рога спинного мозга.

Из лекарственных средств, влияющих на уровень ГАМК в ЦНС, в медицинской практике также используют тиагабин и вигабатрин [8].

Тиагабин (производное R-niprocotic acid derivative) — антиконвульсант, обладает анальгетической активностью. Анальгетический эффект тиагабина связан с повышением содержания нейромедиатора ГАМК, так как препарат является блокатором обратного захвата ГАМК.

Вигабатрин (γ -vinyl-ГАМК) — антиконвульсант, оказывает анальгетическое влияние. Этот препарат — ингибитор ГАМК-трансаминазы, блокирует катаболизм ГАМК, повышает содержание тормозного нейромедиатора ГАМК.

Вещества, блокирующие обратный захват ГАМК, рассматриваются как перспективные вещества для подавления острой и хронической боли [116].

Список литературы

1. Кукушкин М.Л. Патофизиологические механизмы болевых синдромов // Боль, 2003; 1: 1, 5-12.
2. Крыжановский Г.Н. Патологические интеграции в системе болевой чувствительности при центральном болевом синдроме // Боль, 2004, 4, 10-15.
3. Кукушкин М.Л. Неврогенные болевые синдромы: патофизиология, особенности клинической картины, принципы терапии // Consilium medicum, 2005; 7 (2): 133-137.
4. Кукушкин М.Л., Хитров Н.К. Общая патология боли. — М.: Медицина, 2004, с. 144.
5. Кукушкин М.Л. Этиопатогенетические принципы лечения хронической боли // Российский журнал боли, 2007; 15 (10): 1322-1327.
6. Кукушкин М.Л. Невропатическая боль у пациентов с хроническими болями в спине // Российский журнал боли, 2008; 3: 46-51.
7. Кукушкин М.Л. Комплексная терапия неспецифической боли внизу спины // Российский журнал боли, 2010; 1: 33-36.
8. Ясно Н.Н., Кукушкин М.Л. Боль: Практическое руководство для врачей. — М.: Изд-во РАМН, 2011. — 512 с.
9. Ясно Н.Н., Кукушкин М.Л. Хроническая боль: медико-биологические и социально-экономические аспекты // Вестник РАМН, 2012; 9: 54-58.
10. Wiesenfled-Hallin Z., Aldskogius H., Grant G., Hao J.X., Hokfelt T., Xu X.J. Central inhibitory dysfunctions: mechanisms and clinical implications // Behav Brain Sci, 1997; 20: 420-42.
11. Rowbotham M.C. Neuropathic pain: from basic science to evidence-based treatment // Pain 2002 — An Updated Review: Refresher course Syllabus / Ed. M.A. Giamberardino // Pain 2002 — An Updated Review, Seattle, IASP Press, 2002, pp. 165-176.
12. Woolf C.J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain // Pain 2011; 152: S2-S15.
13. Иголькина С.И. Патогенетические механизмы и коррекция центральной невропатической боли (экспериментальное исследование): Автореф. дисс. на соискание ученой степени д.м.н. — М., 2009. — 48 с.
14. Иголькина С.И., Кукушкин М.Л. Гамма-аминомасляная кислота и боль // Российский журнал боли, 2013; 3: 32-43.
15. Demediuk P., Daly M.P., Faden A.I. Effect of impact trauma on neurotransmitter and nonneurotransmitter amino acids in rat spinal cord // J. Neurochem., 1989; 52: 1529-1536.
16. Castro-Lopes J.M., Tavares I., Coimbra A. GABA decreases in the spinal cord dorsal horn after peripheral neurectomy // Brain Res., 1993; 620: 287-291.
17. Zhang A.L., Hao J.X., Seiger A., Xu X.J., Wiesenfled-Hallin Z., Grant G., Aldskogius H. Decreased GABA immunoreactivity in spinal cord dorsal horn neurons after transient spinal cord ischemia in the rat // Brain Res., 1994; 656: 187-190.
18. Ibuki T., Hama A.T., Wang X.-T., Pappas G.D., Sagen J. Loss GABA-immunoreactivity in the spinal dorsal horn of rats with peripheral nerve injury and promotion of recovery by adrenal medullary grafts // Neuroscience, 1997; 76: 845-858.
19. Schuler V., Luscher C., Blanchet C., Klix N., San-sig G., Klebs K., Schmutz M., Heid J., Gentry C., Urban L., Fox A., Spooren W., Jatou A.L., Vigouret J., Pozza M., Kelly P.H., Mosbacher J., Froestl W., Kaslin E., Korn R., Biscohoff S., Kaupmann K., van der Putten H., Bettler. Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B1) // Neuron, 2001; 31: 47-58.
20. Malan T.P., Mata H.P., Porreca F. Spinal GABAA and GABAB receptor pharmacology in a rat model of neuropathic pain // Anesthesiology, 2002; 96: 1161-1167.
21. Moore K.A., Kohno T., Karchewski L.A., Scholz J., Baba H., Woolf C.J. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord // J. Neurosci, 2002; 22: 6724-6731.
22. Miletic G., Draganic P., Pankratz M.T., Miletic V. Muscimol prevents long-lasting potentiation of dorsal horn field potentials in rats with chronic constriction injury exhibiting decreased levels of the GABA transporter GAT-1 // Pain, 2003; 105: 347-353.
23. Drew G.M., Siddall P.J., Duggan A.W. Mechanical allodynia following contusion injury of the rat spinal cord is associated with loss of GABAergic inhibition in the dorsal horn // Pain, 2004; 109: 379-388.
24. Meisner J.G., Marsh A.D., Marsh D.R. Loss of GABAergic interneurons in laminae I-III of the spinal cord dorsal horn contributes to reduced GABAergic tone and neuropathic pain after spinal cord injury // J. Neurotrauma, 2010; 27: 729-737.
25. Roberts E., Frankel S. γ -Aminobutyric acid in brain: Its formation from glutamic acid // Journal of Biological Chemistry, 1950; 187: 55-63.
26. Awapara J., Landua A.J., Fuerst R., Seale B., Awapara J. Free gamma-aminobutyric acid in brain // Journal of Biological Chemistry, 1950; 187: 35-39.
27. Udenfriend S. Identification of gamma-aminobutyric acid in brain by the isotope derivative method // Journal of Biological Chemistry, 1950; 187: 65-69.
28. Olsen R.W. GABA // Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress / Davis R.L., Charney D., Coy J., Nemeroff C. (eds). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002; 160-168.
29. Bohlhalter S., Weinmann O., Mohler H., Fritschy J.-M. Laminar Compartmentalization of GABA- α -Recep-

- tor Subtypes in the Spinal Cord: An Immunohistochemical Study // *Neuroscience*, 1996; 16: 283-297.
30. **Глебов Р.Н., Крыжановский Г.Н.** Функциональная биохимия синапсов. — М.: Медицина, 1978. — 328 с.
31. **Bowery N.G., Hudson A.L., Price G.W.** GABAA and GABAB receptor site distribution in the rat central nervous system // *Neuroscience*, vol. 1987;20: 365-383.
32. **Todd A.J., Sullivan A.C.** Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat // *J. Comp Neurol*, 1990; 296: 496-505.
33. **Yang K., Ma W.L., Feng Y.P., Dong Y.X., Li Y.Q.** Origins of GABA(B) receptor-like immunoreactive terminals in the rat spinal dorsal horn // *Brain Res Bull.*, 2002; 58: 499-507.
34. **Ohara P.T., Granato A., Moallem T.M., Wang B.R., Tillet Y., Jasmin L.** Dopaminergic input to GABAergic neurons in the rostral agranular insular cortex of the rat // *J. Neurocytol.*, 2003; 32: 131-141.
35. **Enna S.J., McCarron K.E.** The role of GABA in the mediation and perception of pain // *Adv Pharmacol*, 2006; 54: 1-27.
36. **Yasaka T., Tiong S.Y.X., Hughes D.I., Riddell J.S., Todd A.J.** Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach // *Pain*, 2010; 151: 475-488.
37. **Curtis D.R., Johnston G.A.R.** Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system // *Ergebn Physiol*, 1974; 69: 97-188.
38. **Ben-Ari Y.** Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture // *Nat Rev Neurosci*, 2002; 3: 728-739.
39. **Ganguly K., Schinder A.F., Wong S.T.** et al. GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition // *Cell*, 2001; 105: 521-532.
40. **Roberts E.** Free amino acids of nervous tissue: some aspects of metabolism of gamma-aminobutyric acid // Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid. Proceeding of an International Symposium, California, 1959, Oxford-New York-London-Paris, Pergamon Press, 1960; 144-158.
41. **Fykse E.M., Fonnum F.** Amino acid neurotransmission: dynamics of vesicular uptake // *Neurochem. Res.* 1996; 21 (9): 1053-1060.
42. **Schousboe A.** Pharmacological and functional characterization of astrocytic GABA transport: a short review // *Neurochem. Res.*, 2000; 25 (9/10): 1241-1244.
43. **Крыжановский Г.Н., Графова В.Н., Данилова Е.З., Игонькина С.И., Сахарова О.П.** Болевой синдром спинального происхождения // *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, 1973; 76 (9): 31-35.
44. **Крыжановский Г.Н., Игонькина С.И., Графова В.Н., Данилова Е.З.** Экспериментальная тригеминальная невралгия (к концепции генераторного механизма болевого синдрома) // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 1974; 78 (11): 16-20.
45. **Крыжановский Г.Н., Игонькина С.И.** Экспериментальные синдромы боли и зуда таламического происхождения // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 1976; 81 (6): 651-653.
46. **Крыжановский Г.Н., Решетняк В.К., Зинкевич В.А., Игонькина С.И., Чалова В.В.** Новая модель аллодинии // *Бюл.эксперим. биол. и мед.*, 1996; 122 (9): 258-261.
47. **Игонькина С.И., Кукушкин М.Л., Ветрилэ Л.А.** Влияние антител к тормозным и возбуждающим нейромедиаторам на развитие нейрогенной боли // *Патогенез*, 2006; 4 (1): 52-53.
48. **Игонькина С.И., Графова В.Н., Смирнова В.С., Ветрилэ Л.А., Захарова И.А., Евсеев В.А., Кукушкин М.Л.** Роль антител к ГАМК и глутамату в патогенезе невропатического болевого синдрома // *Патогенез*, 2012; 10 (4): 36-40.
49. **Игонькина С.И., Ветрилэ Л.А., Кукушкин М.Л.** Роль антител к нейромедиаторам антиноцицептивной системы в механизмах невропатической боли // *Патол. физиол. и эксперим. терапия*, 2013; 3: 32-36.
50. **Кукушкин М.Л., Игонькина С.И., Ветрилэ Л.А., Евсеев В.А.** Влияние антител к глутамату и ГАМК на развитие центрального болевого синдрома // *Российский журнал боли*, 2007, 3: 8-11.
51. **Евсеев В.А., Ветрилэ Л.А., Смирнова В.С., Графова В.Н., Захарова И.А., Трекова Н.А., Кукушкин М.Л.** Аутоантитела к глутамату, ГАМК, норадреналину в механизмах невропатического болевого синдрома // *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, 2008; 145 (5): 521-524.
52. **Игонькина С.И., Крыжановский Г.Н., Зинкевич В.А., Ветрилэ Л.А., Евсеев В.А., Решетняк В.К., Кукушкин М.Л., Башарова Л.А.** Влияние антител к серотонину на развитие невропатического болевого синдрома // *Патол. физиол. и эксперим. терапия*, 1997; 2: 6-8.
53. **Игонькина С.И., Крыжановский Г.Н., Зинкевич В.А., Ветрилэ Л.А., Евсеев В.А., Решетняк В.К., Кукушкин М.Л., Башарова Л.А.** Влияние антител к дофамину на развитие невропатического болевого синдрома у крыс // *Журн. высш. нерв. деят.*, 2000; 50 (6): 999-1006.
54. **Игонькина С.И., Кукушкин М.Л., Башарова Л.А., Ветрилэ Л.А., Миковская О.И., Евсеев В.А.** Влияние антител к серотонину на биоэлектрическую активность сенсорной коры // *Бюл эксперим биол и мед.*, 2001; 131 (5): 517-519.
55. **Yaksh T.L.** Behavioral and autonomic correlates of the tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: effects of modulatory receptor systems and excitatory amino acid antagonists // *Pain*, 1989; 37 (1): 111-123.
56. **Sorkin L.S., Puig S., Jones D.L.** Spinal bicuculline produces hypersensitivity of dorsal horn neurons: Effects of excitatory amino acid antagonists // *Pain*, 1998; 77: 181-190.
57. **Sivilotti L., Woolf C.J.** The contribution of GABA(A) and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord // *J. Neurophysiol*, 1994; 72: 169-179.
58. **Schofield P.R., Darlison M.G., Fujita N., Burt D.R., Stephenson F.A., Rodriguez H., Rhee L.M., Ramachandran J., Reale V., Glencorse T.A.** et al. Sequence and functional expression of the GABAA receptor shows a ligand-gated receptor super-family // *Nature*, 1987; 328: 221-227.
59. **Bowery N.G., Hudson A.I.** Gamma-aminobutyric acid reduces the evoked release of 3H-noradrenaline from sympathetic nerve terminals // *Br J Pharmacol*, 1979; 66: 108P.
60. **Macdonald R.L., Olsen R.W.** GABAA receptor channels // *Annu Rev Neurosci.*, 1994; 17: 569-602.
61. **F.D. Russek S.J.** Mapping of the beta 2 subunit gene (GABRB2) to microdissected human chromosome 5q34-q35 defines a gene cluster for the most abundant GABAA receptor isoform // *Genomics*, т. 23, p. 528-533, 1994.
62. **Wallace R.H., Marini C., Petrou S.** et al Mutant GABA(A) receptor gamma-2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures // *Nature Genet.*, 2001; 28: 49-52.
63. **Mohler H., Benke J., Benson B., Luscher B., Rudolph U., Fritschy J.M.** Diversity in structure, pharmacology, and regulation of GABAA receptor // *The GABA Receptors*

/ Eds. S.J. Enna, N.G. Bower. — Totowa, New Jersey, Humana Press, 1997, p. 11-36.

64. **Olsen R.W., Fischer J.B., Dunwiddie T.V.** Barbiturate enhancement of GABA receptor binding and function as a mechanism of anesthesia // *Molecular and cellular mechanisms of anaesthetics*, edited by Miller K, Roth S. New York, Plenum, 1986, p. 165-177.

65. **Bowery N.G.** GABAB receptor pharmacology // *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1993; 33: 109-117.

66. **Kaupmann K., Huggel K., Heid J., Flor P.J., Bischoff S., Mickel S.J., McMaster G., Angst C., Bittiger H., Froestl W., Bettler B.** Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors // *Nature*, 1997; 386: 239-246.

67. **Bormann J.** The «ABC» of GABA receptors // *Trends Pharmacol. Sci.*, 2000; 21: 16-19.

68. **Barnard E.A., Skolnick P., Olsen R.W., Mohler H., Sieghart W., Biggio G.** et al. Sub-types of γ -aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function // *Pharmacol Rev*, 1998; 50: 291-313.

69. **Kaila K.K.** Ionic basis of GABAA receptor channel function in the nervous system // *Prog Neurobio*, 1994; 42: 489-537.

70. **Семьянов А.В.** Гамк-эргическое торможение в ЦНС: типы ГАМК-рецепторов и механизмы тонического ГАМК-опосредованного тормозного действия // *Нейрофизиология / Neurophysiology*, 2002; 34: 82-92.

71. **Gilbert A.K., Franklin K.B.** GABAergic modulation of descending inhibitory systems from the rostral ventromedial medulla (RVM). Dose-response analysis of nociception and neurological deficits // *Pain*, 2001; 90: 25-36.

72. **Sands S.A., McCarron K.E., Enna S.J.** Relationship between the antinociceptive response to disipramine and changes in GABA(B) receptor function and subunit expression in the dorsal horn of the rat spinal cord // *Biochem. Pharmacol.* 2004; 67: 743-749.

73. **Mohler H., Okada T.** Benzodiazepine receptor — demonstration in the central nervous system // *Science*, 1977; 198: 849-851.

74. **Johnston G.J.** GABAA receptor pharmacology // *Pharmacol. Ther.*, 1996; 69: 173-198.

75. **Eghbali M., Gage P.W., Birnir B.** Pentobarbital modulates gamma-aminobutyric acid-activated single-channel conductance in rat cultured hippocampal neurons // *Mol Pharmacol*, 2000; 58: 463-469.

76. **Pritchett D.B., Luddens H., Seeburg P.H.** Type I and type II GABAA-benzodiazepine receptors produced in transfected cells // *Science*, 1989; 245: 1389-1392.

77. **Aloisi A.M., Craft R.M., Marchand S.** The effects of gonadal hormones on pain // *Proceeding of the 11th World Congress on Pain / Eds. Kalso E., Dostrovsky J.O. Flor H.*, Seattle, IASP Press, 2006, pp. 301-309.

78. **Reyes-Vazquez C., Enna S.J., Dafny N.** The parafasciculus thalami as a site for mediating the antinociceptive response to GABAergic drugs // *Brain Res.*, 1986; 383: 177-184.

79. **Jasmin L., Rabkin S.D., Granato A., Boudah A., O'Hara P.T.** Analgesia and hyperalgesia from GABA-mediated modulation of the cerebral cortex // *Nature*, 2003; 424: 316-320.

80. **Rudolph U., Mohler H.** Analysis of GABAA receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2004; 44: 475-498.

81. **Bowery N.G., Hill D.R., Hudson A.L., Doble A., Midlemis D.N., Shaw J., Turnbull M.** (-)Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor // *Nature*, 1980; 283: 92-94.

82. **Jones K.A., Borowsky B., Tamm J.A., Craig D.A., Durkin M., Dai M., Yao W.J., Johnson M., Gunwaldsen C., Huang L.Y., Tang C., Shen Q., Salon J.A., Morse K., Laz T., Smith K.E., Nagarathnam D., Noble S.A., Branchek T.A., Gerald C.** GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2 // *Nature*, 1998; 396: 674-679.

83. **Bowery N.G., Bettler B., Froestl W., Gallagher J.P., Marshall F., Raiteri M., Bonner T.I., Enna S.J.** Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function // *Pharmacol Rev*, 2002; 54: 247-264.

84. **Mintz I.M., Bean B.P.** GABAB receptor inhibition of P-type Ca²⁺ channels in central neurons // *Neuron*, 1993; 10: 889-898.

85. **Pin J.-P., Kniazeff J., Binet V., Liu J., Maurel D., Galvez T., Duthey B., Havlickova M., Blahos J., Prezeau L., Rondard P.** Activation mechanisms of the heterodimeric GABAB receptor // *Biochem. Pharmacol*, 2004; 68: 1565-1572.

86. **Li D.P., Chen S.R., Pan Y.Z., Levey A.I., Pan H.L.** Role of presynaptic muscarinic and GABA(B) receptors in spinal glutamate release and cholinergic analgesia in rats // *J. Physiol.*, 2002; 543: 807-818.

87. **Blednov Y.A., Stoffel M., Alva H., Harris R.A.** A pervasive mechanism for analgesia: Activation of GIRK2 channels // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 277-282.

88. **Hao J.-X., Xu X.-J., Weisenfeld-Hallin Z.** Intrathecal gamma-aminobutyric acid(B) (GABAB) receptor antagonist CGP 35348 induces hypersensitivity to mechanical stimuli in the rat // *Neurosci Lett*, 1994; 182: 299-302.

89. **Hao J.-X., Xu X.-J., Aldskogius H., Seiger A., Weisenfeld-Hallin Z.** Allodynia-like effect in rat after ischemic spinal cord injury photochemically induced by laser irradiation // *Pain*, 1991; 45: 175-185.

90. **Zheng W., Xie W., Zhang J., Strong J.A., Wang L., Yu L., Xu M., Lu L.** Function of g-aminobutyric acid receptor/channel r1 subunits in spinal cord // *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 48321-48329.

91. **Green G.M., Dickenson A.** GABA-receptor control of the amplitude and duration of the neuronal responses to formalin in the rat spinal cord // *Eur. J. Pain*, 1997; 1: 95-104.

92. **Kaneko M., Hammond D.L.** Role of spinal gamma-aminobutyric acid A receptors in formalin-induced nociception in the rat // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1997; 282: 928-938.

93. **Hwang J.H., Yaksh T.L.** The effect of spinal GABA receptor agonists on tactile allodynia in a surgically-induced neuropathic pain model in the rat // *Pain*, 1997; 70:15-20.

94. **Rode F., Jensen D.G., Blackburn-Munro G., Bjerrum O.J.** Centrally-mediated antinociceptive actions of GABAA receptor agonists in the rat spared nerve injury model of neuropathic pain // *Eur. J. Pharmacol.*, 2005; 516: 131-138.

95. **Eaton M.J., Martinez M.A., Karmally S.** A single intrathecal injection of GABA permanently reverses neuropathic pain after nerve injury // *Brain Res.*, 1999; 835: 334-339.

96. **Nadeson R., Guo Z., Porter V., Gent J.P., Goodchild C.S.** Gammaaminobutyric acid A receptors and spinally mediated antinociception in rats // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996. 278: 620-626.

97. **Yokoro C.M., Pesquero S.M., Turchetti-Maia R.M., Francischi J.N., Tatsuo M.A.** Acute phenobarbital administration induces hyperalgesia: Pharmacological evidence for the involvement of supraspinal GABA-A receptors // *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2001; 34: 397-405.

98. **Depaulis A., Morgan M.M., Liebeskind J.C.** GABAergic modulation of the analgesic effects of morphine microinjected in the ventral periaqueductal gray matter of the rat // *Brain Res.*, 1987; 436: 223-228.

99. *Hough L.B., Nalwalk J.W., Leurs R., Menge W.M., Timmerman H.* Significance of GABAergic systems in the action of impropion, a non-opioid analgesic // *Life Sci.*, 2001; 68: 2751-2757.
100. *Игонькина С.И., Крыжановский Г.Н.* Анальгезия при электростимуляции ядер среднего мозга у крыс с болевым синдромом спинального происхождения // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 1977. Т. 84. №7. С. 16-19.
101. *Крыжановский Г.Н., Игонькина С.И.* Анальгезия, вызванная созданием генератора возбуждения в среднем мозгу // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.*, 1978; 85 (2): 145-148.
102. *Nguyen T.T., Matsumoto K., Watanabe H.* Involvement of supraspinal GABA-ergic systems in clonidine-induced antinociception in the tail-pinch test in mice // *Life Sci.*, 1997; 61: 1097-1103.
103. *Dirig D.M., Yaksh T.L.* Intrathecal baclofen and muscimol, but not midazolam, are antinociceptive using the rat-formalin model // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1995; 275: 219-227.
104. *Von Heijne, M., Hao J.X., Sollevi A., Xu X.J.* Effects of intrathecal morphine, baclofen, clonidine and R-PIA on the acute allodynia-like behaviours after spinal cord ischaemia in rats // *Eur. J. Pain*, 2001; 5: 1-10.
105. *Franek M., Vaculin S., Rokyta R.* GABAB receptor agonist baclofen has nonspecific antinociceptive effect in the model of peripheral neuropathy in the rat // *Physiol. Res*, 2004; 53: 351-355.
106. *Zarrindast M.-R., Valizadeh S., Sahebgharani M.* GABAB receptor mechanism and imipramine-induced antinociception in ligated and non-ligated mice // *Eur. J. Pharmacol.*, 2000; 407: 65-72.
107. *Ugarte S.D., Homanics G.E., Firestone L.L., Hammond D.L.* Sensory thresholds and the antinociceptive effects of GABA receptor agonists in mice lacking the $\beta 3$ subunit of the GABAA receptor // *Neuroscience*, 1999; 95: 795-806.
108. *Thomas D.A., McGowan M.K., Hammond D.L.* Microinjection of baclofen in the ventromedial medulla of rats: Antinociception at low doses and hyperalgesia at high doses // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1995; 275: 274-284.
109. *Thomas D.A., Navarrete I.M., Graham B.A., McGowan M.K., Hammond D.L.* Antinociception produced by systemic R(10)-baclofen hydrochloride is attenuated by CGP35348 administered to the spinal cord or ventromedial medulla of rats // *Brain Res.*, 1996; 718: 129-137.
110. *Sands S.A., McCarson K.E., Enna S.J.* Differential regulation of GABAB receptor subunit expression and function // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2003; 305: 191-196.
111. *McCarson K.E., Ralya A., Reisman S.A., Enna S.J.* Amitriptyline prevents thermal hyperalgesia and modifications in rat spinal cord GABAB receptor expression and function in an animal model of neuropathic pain // *Biochem. Pharmacol.*, 2005; 71 (1-2):196-202.
112. *Ван Роени Дж., Пэйс А., Преодер М.И.* Диагностика и лечение боли, Москва: Издательство БИНОМ, 2012. 495 с.
113. *Zorn S.H., Enna S.J.* GABAuptake inhibitors produce a greater antinociceptive response in the mouse tail-immersion assay than other types of gabaergic drugs // *Life Sciences*, 1985; 37 (20): 1901-1912.
114. *Laughlin T.M., Tram K.V., Wilcox G.L., Birnbaum A.K.* Comparison of antiepileptic drugs tiagabine, lamotrigine, and gabapentin in mouse models of acute, prolonged, and chronic nociception // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2002; 302: 1168-1175.
115. *Todorov A.A., Kolchev C.B., Todorov A.B.* Tiagabine and gabapentin for the management of chronic pain // *Clin. J. Pain*, 2005; 21: 358-361.
116. *Salat K., Kulig K.* GABA transporters as targets for new drugs // *Future Medicinal Chemistry*, 2011; 3: 211-222.
117. *Martin D. L., Rimvall K.* Regulation of γ -aminobutyric acid synthesis in the brain // *J. Neurochem*, 1993; 60: 395-407.
118. *Zhu S.S., Zeng Y.M., Wang J.K., Yan R., Nie X., Cao J.L.* Inhibition of thermal hyperalgesia and tactile allodynia by intrathecal administration of gammaaminobutyric acid transporter-1 inhibitor NO-711 in rats with chronic constriction injury // *Sheng Li Xue Bao*, 2005; 57: 233-239.
119. *Reichl S., Augustin M., Zahn P.K., Pogatzki-Zahn E.M.* Peripheral and spinal GABAergic regulation of incisional pain in rats // *Pain*, 2012; 153: 129-141.
120. *Dworkin R.H., Corbin A.E., Young J.P., Sharma U., LaMoreaux L., Bockbrader H., Garofalo E.A., Poole R.M.* Pregabalin for the treatment of postherpetic neuralgia: A randomized, placebo-controlled trial // *Neurology*, 2003; 60: 1274-1283.
121. *Johansen T.N., Abrahamsen B., Mattsson J.P., Lehmann A., Bettler B., Brauner-Osborne H.* The anticonvulsant gabapentin (neurontin) does not act through gamma-aminobutyric acid-B receptors // *Mol Pharmacol*, 2002; 6: 1377-1384.
122. *Lanneau C., Green A., Hirst W.D., Wise A., Brown J.T., Dennier E., Charles K.J., Wood M., Davies C.H., Pangalos M.N.* Gabapentin is not a GABAB receptor agonist // *Neuropharmacology*, 2001; 41: 965-975.
123. *Ng G.Y.K., Bertrand S., Sullivan R., Ethier N., Wang J., Yergey J., Belley M., Trimble L., Bateman K., Alder L., Smith A., McKernan R.* et al. γ -Aminobutyric acid type B receptors with specific heterodimer composition and postsynaptic actions in hippocampal neurons are targets of anticonvulsant gabapentin action // *Mol. Pharmacol.*, 2001; 59: 144-152.
124. *Hering-Hanit R.* Baclofen for prevention of migraine // *Cephalalgia*, 1999; 19: 589-591.
125. *Lind G., Meyerson B.A., Winter J., Linderoth B.* Intrathecal baclofen as adjuvant therapy to enhance the effect of spinal cord stimulation in neuropathic pain: A pilot study // *Eur. J. Pain*, 2004; 8: 377-383.
126. *Sindrup S.H., Jensen T.S.* Pharmacotherapy of trigeminal neuralgia // *Clin J Pain*, 2002; 18: 22-27.
127. *Slonimski M., Abram S.E., Zuniga R.E.* Intrathecal baclofen in pain management // *Reg. Anesth. Pain Med.*, 2004; 29: 269-276.

Поступила 26.12.13

Сведения об авторах:

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

Игонькина Светлана Ивановна, д-р биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБУ «НИИ ОПП» РАМН

Л.Н. Маслов, Е.И. Барзах, А.Ю. Лишманов, А.С. Горбунов, С.Ю. Цибульников, А.С. Семенцов

Агонисты опиоидных рецепторов могут усугублять ишемические и реперфузионные повреждения сердца

ФГБУ «НИИ кардиологии» СО РАМН, ул. Киевская, 111, 634012, Томск

Авторы проанализировали статьи о том, что опиоиды могут усугублять ишемические и реперфузионные повреждения сердца, а антагонисты опиоидных рецепторов могут предупреждать эти повреждения. Авторы заключили, что существует пул опиоидных рецепторов, активация которого снижает толерантность сердца к действию ишемии-реперфузии.

Ключевые слова: сердце, ишемия, реперфузия, опиоидные рецепторы, размер инфаркта, аритмии

L.N. Maslov, E.I. Barzakh, A.Yu. Lishmanov, A.S. Gorbunov, S.Yu. Tsybulnikov, A.S. Sementsov

Agonists of opioid receptors may aggravate ischemic and reperfusion damages of the heart

Federal State Budgetary Institution «Research Institute for Cardiology» of Siberian Branch under the Russian Academy of Medical Sciences

Authors analyzed articles that opioids may aggravate ischemic and reperfusion damages of the heart but the opioid receptor antagonists may prevent these damages. Authors concluded the it is existed opioid receptor pool an activation of its decreases cardiac tolerance to an impact of ischemia-reperfusion.

Key words: heart, ischemia, reperfusion, opioid receptors, infarct size, arrhythmias

В литературе широко распространена точка зрения о том, что агонисты опиоидных рецепторов (ОР) проявляют кардиопротекторные свойства. С этим мнением можно ознакомиться в соответствующих обзорах [6, 7, 14]. Однако существует множество публикаций, авторы которых утверждают, что агонисты ОР могут снижать устойчивость сердца к действию ишемии-реперфузии, а антагонисты ОР, напротив, повышают толерантности миокарда к гипоксии и ре-оксигенации. В данном обзоре мы проанализируем именно эти публикации и попытаемся разобраться в причинах существования альтернативных мнений о роли опиоидов в регуляции резистентности сердца к действию ишемии-реперфузии.

Активация опиоидных рецепторов усугубляет ишемические и реперфузионные повреждения сердца

Как мы уже говорили, существует ряд работ о том, что стимуляция опиоидных рецепторов может усугублять ишемические и реперфузионные повреждения сердца. Так, в 1979 г. J.R. Kistner с соавторами [20] обнаружили, что внутривенное введение пациентам морфина в дозе 2,1 мг/кг вызывает снижение сегмента ST. Авторы расценили этот эффект как проявление ишемии миокарда. Следует отметить, что в российской практике морфин у пациентов с острым коронарным синдромом применяется в дозе 0,1 мг/кг внутривенно

[1]. В литературе нет данных о том, что в дозе 0,1 мг/кг морфин может провоцировать ишемию сердца. В 1979 г. израильские физиологи [19] обнаружили, что морфин в дозе 1 мг/кг внутривенно увеличивает подъём сегмента ST у кошек с коронароокклюзией, что они расценили, как усиление ишемии сердца. Однако они не определяли соотношение зона инфаркта/область риска (ЗИ/ОР, где область риска — зона ишемии), что в настоящее время считается методически неверным. Этот факт заставляет усомниться в том, что морфин усиливал ишемические повреждения сердца. Вместе с тем, никто не оценивал влияние морфина в дозе 1 мг/кг на размер инфаркта у кошек, поэтому нельзя полностью исключить возможность усиления ишемических повреждений сердца у кошек после инъекции этого опиата в указанной дозе. В 1982 г. тот же коллектив авторов [25] получил данные о том, что морфин может увеличивать размер инфаркта у крыс. Препарат вводили в дозе 3 мг/кг внутривенно за 10 мин до 48-часовой коронароокклюзии без реперфузии. Авторы оценивали размер инфаркта, но не определяли соотношение ЗИ/ОР. Кроме того, данные израильских физиологов [25] противоречат результатам их китайских коллег, которые показали, что морфин в дозе 8 мг/кг (вводили до изоляции сердца) обеспечивает уменьшение индекса ЗИ/ОР в опытах на изолированном перфузируемом сердце крыс [47]. Эти факты позволяют усомниться в достоверности данных израильских исследователей.

В 1985 г. физиологи из Гонконга [22] опубликовали данные о том, что добавление в перфузионный раствор налоксона в концентрации 1,1 или 3,6 мМ/л уменьшает ишемические и реперфузионные повреждения изолированного сердца. Следует отметить, что IC_{50} у налоксона по отношению к μ -ОР и δ -ОР составляет 8,2 нМ [21]. Согласно данным В.Р. Roques с соавторами [34], K_i у налоксона по отношению к μ -ОР составляет 3,4 нМ, а K_i по отношению к δ -ОР равняется 50 нМ. Представленные сведения говорят о том, что кардиопротекторный эффект налоксона, по всей видимости, является результатом неспецифического мембраностабилизирующего эффекта препарата, а не следствием блокады ОР. Необходимо отметить, что мы не наблюдали инфаркт-лимитирующих свойств у налоксона, как и у большинства других антагонистов ОР. Практически все другие авторы также не отмечали кардиопротекторных свойств у блокаторов ОР. Исключение составляет работа Z. Chen с соавторами [13]. В экспериментах на изолированном перфузируемом сердце крысы они моделировали глобальную ишемию (45 мин) и реперфузию (60 мин), антагонисты ОР добавляли в перфузат в момент начала реперфузии. Перфузия раствором Кребса—Хензеляита продолжалась в течение 10 мин. Некроз кардиомиоцитов оценивали по соотношению ЗИ/ОР (в данном случае за область риска принимали левый желудочек) и по уровню креатинфосфокиназы-МВ (КФК-МВ) в перфузате, оттекающем от сердца [13]. Антагонисты ОР использовали в следующих концентрациях: налоксон — 10 нМ/л; налтриндол (δ -антагонист) — 5 нМ/л; нор-биналторфин (κ -антагонист) — 5 нМ/л. Оказалось, все три антагониста уменьшают индекс ЗИ/ОР и выброс КФК-МВ. Используемые концентрации антагонистов приближаются к K_i или IC_{50} [16, 21, 34], поэтому в данном случае объяснить кардиопротекторный эффект антагонистов ОР мембраностабилизирующим действием нельзя. В экспериментах *in vivo* мы [8] обнаружили, что внутривенное введение крысам агониста μ -ОР СТАР (1 мг/кг) перед коронароокклюзией (20 мин) и реперфузией (3 ч) способствует уменьшению соотношения ЗИ/ОР. Возможно, что инфаркт-лимитирующие свойства СТАР связаны с активацией рецепторов соматостатина, к которым этот пептид проявляет умеренное сродство [18]. Соматостатин, как известно [43], в опытах *in vivo* ограничивает соотношение ЗИ/ОР, поэтому наше предположение о механизме кардиопротекторного действия СТАР представляется обоснованным.

Представленные данные говорят о негативной роли ОР и эндогенных опиоидов в регуляции толерантности сердца к действию ишемии-реперфузии. Результаты наших исследований [3, 9] свидетельствуют о том, что существует пул опиоидных или неопиоидных рецепторов, активация которых опиоидами негативно сказывается на устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии.

Так, в экспериментах на изолированном сердце мы обнаружили [3, 9], что кардиопротекторный эффект δ_1 -агониста DPDPE исчезает, если концентрацию пептида в перфузионном растворе увеличить до 0,5 мг/л. Фармакологи из группы проф. G.J. Gross [30] в экспериментах на изолированных перфузируемых сердцах мышцей моделировали глобальную ишемию-реперфузию. Им не удалось обнаружить кардиопротекторный эффект у морфина, который они применяли в концентрации 10 мкМ/л. В то же время исследователи из Алабамы в экспериментах [28], выполненных на изолированном перфузируемом сердце кролика, обнаружили инфаркт-лимитирующий эффект морфина в конечной концентрации — 0,3 мкМ. Представляется весьма вероятным, что концентрация морфина в 10 мкМ/л была настолько большой, что морфин стал воздействовать на тот пул опиоидных или неопиоидных рецепторов, активация которых негативно влияет на толерантность миокарда к ишемии-реперфузии. Фармакологам из группы проф. G.J. Gross [30] не удалось обнаружить кардиопротекторные свойства у δ -агониста BW373U86, который они использовали в экспериментах на сердцах мышцей в концентрации 1 мкМ/л. Согласно данным физиологов из Чикаго [27], BW373U86 в конечной концентрации 10 пМ/л повышает устойчивость изолированных кардиомиоцитов к действию гипоксии и реоксигенации. Возможно, что концентрация BW373U86 в 1 мкМ/л также оказалась слишком большой, чтобы опиоид активировал только δ -ОР. Не удалось им обнаружить и кардиопротекторный эффект κ_1 -агониста U50,488, который они использовали в концентрации 1 мкМ/л [30]. Следует отметить, что для ингибирования связывания с клеточными мембранами [3H]U-69593 (агонист κ -ОР) IC_{50} у U50,488 составляет 7,4 нМ [21]. Некоторые исследователи [28] в экспериментах *in vitro* предлагают использовать опиоиды в концентрации, которая в 10 раз выше K_i или IC_{50} , поэтому оптимальной концентрацией для U50,488 является 74 нМ. В 2000 г. К.А. Aitchison [10] опубликовали результаты своих экспериментов на изолированном перфузируемом сердце крысы. Выяснилось, что DADLE (10 нМ/л) оказывает инфаркт-лимитирующий эффект, а при увеличении концентрации до 1 мкМ/л кардиопротекторный эффект уменьшается. Блокада κ -ОР нор-биналторфином приводит к усилению кардиопротекторного эффекта большой концентрации DADLE. Эти данные во многом напоминают результаты наших вышеупомянутых исследований с DPDPE [3, 9]. Кроме того, К.А. Aitchison с соавторами [10] установили, что неселективный агонист κ -ОР бремезодин (30 нМ/л) в опытах *in vitro* вызывает увеличение соотношения ЗИ/ОР. Этот «проинфарктный» эффект бремезодина исчезал после блокады κ -ОР. В этой связи следует отметить, что U50,488 является селективным агонистом κ_1 -ОР, а бре-

мазоцин — агонистом K_2 -ОР [35]. Представляется логичным предположить, что активация K_2 -ОР вызывает снижение толерантности сердца к ишемии и реперфузии.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о существовании пула опиоидных рецепторов, активация которого усугубляет ишемические и реперфузионные повреждения сердца.

Активация опиоидных рецепторов способствует возникновению аритмий при ишемии и реперфузии сердца

В своих исследованиях мы показали [4, 5], что селективная блокада μ -, δ_1 -, δ_2 -, κ - K_2 - и ORL1-рецепторов не влияет на частоту возникновения аритмий при коронароокклюзии и реперфузии. Ни в одном эксперименте нам не удалось обнаружить антиаритмический эффект у налоксона, налтрексона и налоксона метиодида, что согласуется с данными большинства авторов. Однако существует ряд публикаций, авторы которых утверждают [11, 17, 23, 26, 29, 41, 45, 49], что антагонисты ОР оказывают антиаритмический эффект, а опиониды могут проявлять аритмогенные и проаритмогенные свойства [40, 44—46, 48]. Остановимся на этих работах более подробно.

В 1987 г. группа исследователей [44] в экспериментах на изолированном сердце обнаружила, что добавление в перфузат пептидного K -агониста динорфина₁₋₁₃ способствует появлению желудочковых аритмий. В 1993 г. J.-P. Wu с соавторами [46] установили, что внутривенное введение крысам с коронароокклюзией (30 мин) динорфина (300 нМ/кг) усиливает аритмогенный эффект ишемии. В 1995 г. C.S. Yang с соавторами [48] в экспериментах на изолированном перфузируемом сердце с коронароокклюзией обнаружили, что добавление в перфузат динорфина₁₋₁₃ (мкг/сердце) усиливает аритмогенный эффект ишемии. Следует отметить, что динорфин, подобно другим эндогенным опиоидным пептидам, в тканях быстро подвергается энзиматическому гидролизу с образованием пептидов, которые не взаимодействуют с ОР, но могут активировать неопиоидные рецепторы, что может негативно сказываться на электрической стабильности сердца. Так, американские физиологи ещё в 1982 г. показали [36, 37], что Tyr^1 -D-Ala²-Leu-энкефалинамид и Des- Tyr^1 -D-Ala²-Leu-энкефалинамид оказывают совершенно идентичные эффекты на состояние гемодинамики у собак. Однако эффекты Tyr^1 -D-Ala²-Leu-энкефалинамида зависели от активации ОР [37], в то время как эффекты Des- Tyr^1 -D-Ala²-Leu-энкефалинамида сохранялись в условиях блокады ОР налоксоном [37]. В экспериментах на изолированном перфузируемом сердце мы обнаружили [2], что агонист μ - и δ -ОР даларгин и его неопиоидный аналог Des- Tyr^1 -даларгин оказывают отрицательный инотропный эффект и предупреждают возникнове-

ние реперфузионных аритмий. Исходя из сказанного, наша гипотеза о том, что аритмогенный эффект динорфина₁₋₁₃, может быть следствием активации неопиоидных рецепторов продуктами метаболизма динорфина, представляется обоснованной. В 1990 г. T.M. Wong с соавторами [45] в экспериментах на изолированном сердце обнаружили, что U50,488 в дозе 44-396 нМ/сердце (они рассчитывали дозу на сердце, а не конечную концентрацию в перфузате) оказывает выраженный аритмогенный эффект, начиная с дозы 44 нМ/сердце. Агонист μ -ОР DAMGO оказывал аритмогенный эффект, начиная с дозы 132 нМ/сердце. Агонисты δ -ОР DADLE и DPDPE не обладали аритмогенной активностью [45]. В 1992 г. A.Y. Lee с соавторами [23] опубликовали результаты опытов на крысах с коронароокклюзией и реперфузией. Оказалось, что предварительное введение U50,488 оказывает проаритмогенный эффект, в то время как налоксон снижает частоту возникновения желудочковых аритмий. В 2002 г. D.C. Sigg с соавторами [40] показали, что внутривенное введение свиньям перед коронароокклюзией неселективного агониста δ -рецепторов DADLE (1 мг/кг) усиливает аритмогенный эффект ишемии.

В 1983 г. фармакологи из США [113] обнаружили, что внутривенное введение свиньям налоксона (1, 3, 10 мг/кг) предупреждает возникновение желудочковой фибрилляции при коронароокклюзии (20 мин) и реперфузии (15 мин). Авторы заключили, что эндогенные опиониды способствуют возникновению аритмий при ишемии-реперфузии. В 1985 г. физиологи из Гонконга [49] в экспериментах на изолированном перфузируемом сердце крысы показали, что добавление в перфузат налоксона препятствует возникновению ишемических и реперфузионных аритмий. Антиаритмический эффект этого антагониста усиливался по мере увеличения концентрации налоксона [49]. В 1992 г. A.Y. Lee [23] показал, что (-)-налоксон (2,7 мкМ/кг внутривенно) предупреждает возникновение аритмий при коронароокклюзии и реперфузии у собак, в то время как его неактивный стереоизомер (+)-налоксон не влиял на частоту возникновения аритмий при ишемии-реперфузии сердца. В 1989 г. шотландские фармакологи [41] в экспериментах на крысах с коронароокклюзией обнаружили, что налоксон в дозе 0,5 мг/кг или 2 мг/кг внутривенно оказывает выраженный антиаритмический эффект, который исчезал при увеличении дозы до 5 мг/кг. Сходный антиаритмический эффект оказывал налоксона метилбромид (1 мг/кг), который не проникает через ГЭБ. Антагонист κ -ОР MR2266 дозозависимо снижал частоту возникновения окклюзионных аритмий [41]. Эти факты позволили авторам статьи заключить, что блокада периферических ОР обеспечивает повышение толерантности сердца к аритмогенному влиянию коронароокклюзии. Физиологи из группы проф. T.M. Wong в экспериментах на изолиро-

ванном перфузируемом сердце моделировали глобальную ишемию (20 мин) и последующую реперфузию [45]. В этих условиях налоксон оказывал антиаритмический эффект, ещё более существенное повышение устойчивости сердца к аритмогенному влиянию ишемии отмечалось при добавлении в перфузат MR2266. Авторы статьи заключили, что К-ОР участвуют в патогенезе аритмий, связанных с ишемией-реперфузией сердца, а блокада этих рецепторов обеспечивает повышение толерантности сердца к аритмогенному влиянию ишемии и реперфузии [45]. Следует отметить, что в более поздней работе тот же коллектив исследователей утверждал прямо противоположное [42]. В 1992 г. М. McIntosh с соавторами [26] в экспериментах на крысах 30-минутной коронароокклюзией показали, что налтрексон (2,5 мг/кг внутривенно) и нор-биналторфимин (2,5 мг/кг внутривенно) предупреждают появление желудочковых аритмий. Авторы заключили [26], что появление аритмий при коронароокклюзии связано с активацией К-ОР, а К-антагонисты могут в будущем найти применение в качестве антиаритмиков. В 1992 г. M.N. Kap с соавторами установили [17], что антиаритмический эффект оказывает (-)-налоксон (1 мг/кг внутривенно), но не его стереоизомер (+)-налоксон с низким сродством к ОР. Этот факт авторы рассматривают, как доказательство участия эндогенных опиоидных пептидов в аритмогенезе. В 1999 г. ирландские фармакологи [29] в экспериментах на кроликах показали, что предварительное внутривенное введение налтрексона (2 мг/кг) или метилналтрексона (2 мг/кг), который не проникает через ГЭБ, способствует снижению частоты возникновения желудочковых аритмий при коронароокклюзии. Авторы заключили [29], что блокада периферических ОР может способствовать повышению толерантности сердца к аритмогенному действию ишемии.

Представленные данные свидетельствуют о том, что антагонисты ОР могут оказывать антиаритмический эффект, а диноρφин, U50,488 и DADLE проявляют проаритмогенные свойства. Как мы уже отмечали выше в своих исследованиях, мы ни разу не наблюдали антиаритмического эффекта у антагонистов ОР и проаритмогенного эффекта у опиоидов. В этой связи следует отметить, что реакция сердечно-сосудистой системы на введение опиоидов зависит от типа анестетика. Так, согласно данным G.E. Sander с соавторами [38], внутривенная инъекция мет-энкефалина вызывала у ненаркотизированных собак тахикардию; у собак, которым вводили хлоралозу, также отмечалась тахикардия; а у животных, наркотизированных пентобарбиталом, после инъекции мет-энкефалина была обнаружена брадикардия. Свои эксперименты мы проводили на крысах, наркотизированных хлоралозой или кетаминном, в то время как фармакологи, обнаружившие антиаритмический эффект антагонистов ОР, исследования проводили на жи-

вотных, наркотизированных барбитуратами. Можно предположить, что антиаритмический эффект или отсутствие такого эффекта у антагонистов ОР зависит от типа использованного анестетика. Кроме того, нельзя исключить существование субтипа К-ОР, активация которого негативно сказывается на устойчивости сердца к аритмогенному влиянию ишемии-реперфузии.

Роль опиоидных пептидов в патогенезе реперфузионной сократительной дисфункции сердца (РСДС)

Выше речь шла об антиаритмических эффектах антагонистов ОР. Однако есть отдельные публикации, авторы которых утверждают, что антагонисты ОР также могут влиять на РСДС [12, 15, 24, 32, 33]. Исследователи из Тайваня обнаружили, что внутривенное введение собакам налоксона (1 мг/кг) перед коронароокклюзией способствует увеличению давления в левом желудочке (ЛЖ) сердца и увеличивает скорость сокращения ЛЖ во время ишемии-реперфузии [12, 24]. Неактивный стереоизомер налоксона ((+)-налоксон) не влиял на параметры сократимости сердца [12]. Этот факт позволил авторам заключить, что эндогенные опиоиды участвуют в патогенезе РСДС. В 2004 г. M.A. Romano соавт. [33] опубликовали результаты своих экспериментов на изолированном сердце крысы, которое подвергали кардиоплегической остановке (2 ч при +34°C). Оказалось, что предварительная (до ишемии) блокада δ -ОР налтриндолом (1 мкМ/л) или ингибирование К-ОР нор-биналторфимином (1 мкМ/л) усугубляет РСДС. Следует отметить, что в концентрации 1 мкМ/л нор-биналторфимин блокирует не только К-ОР, но и другие опиоидные рецепторы [31]. У налтриндола K_i по отношению к δ -ОР составляет 0,18 нМ, а K_i по отношению к μ -ОР — 3,8 нМ [39]. Следовательно, представленные авторами данные говорят только о том, что блокада всех ОР усугубляет РСДС, а эндогенные опиоидные пептиды препятствуют возникновению РСДС. Действительно, M.A. Romano с соавт. [33] после двухчасовой ишемии обнаружили увеличение в миокарде уровня мет-энкефалина и диноρφина D. Следует отметить, что ни мы, ни большинство других исследователей не наблюдали изменения насосной функции изолированного сердца под действием антагонистов ОР. В 2006 г. M.A. Grosse Hartlage [15] опубликовали результаты своих экспериментов на ненаркотизированных собаках с хронически имплантированными катетерами, один из которых был установлен в полость ЛЖ. У собак воспроизводили 10-минутную коронароокклюзию и реперфузию. Внутривенное введение нор-биналторфимина (2,5 мг/кг) перед ишемией способствовало усилению силы сокращений ЛЖ в реперфузионном периоде.

Представленные данные свидетельствуют о том, что антагонисты ОР в экспериментах *in vivo* могут препятствовать возникновению РСДС.

Заключение

Таким образом, анализ представленных данных свидетельствует, что существуют рецепторы (предположительно κ_2 -ОР), активация которых опиоидами усиливает ишемические и реперфузионные повреждения сердца.

Работа подготовлена при поддержке Федерального агентства по науке и инновациям государственный контракт №11.519.11.2016, №11.519.11.2028, РФФИ гранты: 11-04-00467, 11-04-98001, 11-04-98000, 11-04-98004, 12-04-91152. Авторы выражают признательность за техническую помощь Данильченко Н.А., Октопусу М., Хохловой И.С.

Список литературы

1. **Военнов О.В., Бояринов Г.А.** Применение анальгезии морфином у пациентов с острыми формами ишемической болезни сердца // *Анестезиол. реаниматол.* — 2005. — №3. — С. 57-59.
2. **Ласукова Т.В., Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б.** и др. Влияние даларгина и дез-тир-даларгина на функциональное состояние интактного сердца и миокарда подвергнутого воздействию ишемии-реперфузии // *Экспер. и клин. фармакол.* — 2004. — Т. 67, №4. — С. 21-25.
3. **Ласукова Т.В., Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Гросс Г.Дж.** Роль δ_1 -опиатных рецепторов в регуляции сократимости изолированного сердца крыс в условиях нормальной оксигенации и ишемии-реперфузии // *Известия АН. Серия биол.* — 2004. — Т. 31, №1. — С. 92-99.
4. **Лишманов А.Ю., Ласукова Т.В., Маслов Л.Н., Платонов А.А.** Роль каппа-опиоидных рецепторов в регуляции устойчивости миокарда к аритмогенному действию ишемии/реперфузии // *Росс. физиол. журн.* — 2006. — Т. 92, №12. — С. 1419-1428.
5. **Маслов Л.Н., Лишманов А.Ю., Буданкова Е.В.** и др. Вклад эндогенной опиоидной системы в регуляцию устойчивости сердца к аритмогенному действию кратковременной ишемии и реперфузии // *Известия РАН. Серия биол.* — 2005. — Т. 32, №4. — С. 453-459.
6. **Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Соленкова Н.В.** Адаптация миокарда к ишемии. Первая фаза ишемического preconditionирования // *Успехи физиол. Наук.* — 2006. — Т. 37, №3. — С. 25-41.
7. **Маслов Л.Н.** Новые подходы к профилактике и терапии ишемических и реперфузионных повреждений сердца при остром инфаркте миокарда // *Сиб. мед. журн. (Томск).* — 2010. — Т. 25, №2. — С. 17-24.
8. **Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В., Цибульников С.Ю.** и др. Роль опиоидных рецепторов и связанных с ними внутриклеточных сигнальных каскадов в регуляции устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии // *Кардиоваск. терап. Профилактика.* — 2011. — Т. 10, №6. — С. 200-201.
9. **Платонов А.А., Ласукова Т.В., Маслов Л.Н.** и др. Агонисты опиоидных рецепторов предупреждают появление необратимых повреждений кардиомиоцитов при ишемии — реперфузии изолированного сердца // *Экспер. и клин. фармакол.* — 2004. — Т. 47, №6. — С. 26-29.
10. **Aitchison K.A., Baxter G.F., Awan M.M.** et al. Opposing effects on infarction of delta and kappa opioid receptor activation in the isolated rat heart: implications for ischemic preconditioning // *Basic Res. Cardiol.* — 2000. — Vol. 95, №1. — P. 1-10.
11. **Bergey J.L., Beil M.E.** Antiarrhythmic evaluation of naloxone against acute coronary occlusion-induced arrhythmias in pigs // *Eur. J. Pharmacol.* — 1983. — Vol. 90, №4. — P. 427-431.
12. **Chen Y.T., Lin C.J., Lee A.Y.** et al. Stereospecific blocking effects of naloxone against hemodynamic compromise and ventricular dysfunction due to myocardial ischemia and reperfusion // *Int. J. Cardiol.* — 1995. — Vol. 50, №2. — P. 125-129.
13. **Chen Z., Li T., Zhang B.** Morphine preconditioning protects against reperfusion injury in the isolated rat hearts // *J. Surg. Res.* — 2008. — Vol. 145, №2. — P. 287-294.
14. **Gross E.R., Gross G.J.** Ligand triggers of classical preconditioning and postconditioning // *Cardiovasc. Res.* — 2006. — Vol. 70, №2. — P. 212-221.
15. **Grosse Hartlage M.A., Theisen M.M., Monteiro de Oliveira N.P.** et al. κ -Opioid receptor antagonism improves recovery from myocardial stunning in chronically instrumented dogs // *Anesth. Analg.* — 2006. — Vol. 103, №4. — P. 822-832.
16. **Heijna M.H., Padt M., Hogenboom F.** et al. Opioid receptor-mediated inhibition of dopamine and acetylcholine release from slices of rat nucleus accumbens, olfactory tubercle and frontal cortex // *Eur. J. Pharmacol.* — 1990. — Vol. 181, №3. — P. 267-278.
17. **Kan M.N., Chen Y.T., Lee A.Y.** Naloxone reversal of ischemic arrhythmia is stereospecific and suggests role of endogenous opioid peptides in ischemic heart disease // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* — 1992. — Vol. 200, №4. — P. 518-521.
18. **Kazmierki W., Wire W.S., Lui G.K.** et al. Design and synthesis of somatostatin analogues with topographical properties that lead to highly potent and specific μ opioid receptor antagonists with greatly reduced binding at somatostatin receptors // *J. Med. Chem.* — 1988. — Vol. 31, №11. — P. 2170-2177.
19. **Kisin I., Markiewicz W., Birkhahn J.** Effect of large doses of morphine on experimental myocardial ischemia in cats // *Isr. J. Med. Sci.* — 1979. — Vol. 15, №7. — P. 588-591.
20. **Kistner J.R., Miller E.D., Lake C.L., Ross W.T.** Indices of myocardial oxygenation during coronary-artery revascularization in man with morphine versus halothane anesthesia // *Anesthesiology.* — 1979. — Vol. 50, №4. — P. 324-330.
21. **Lahti R.A., Mickelson M.M., McCall J.M., Von Voigtlander P.F.** [3 H]U-69593 a highly selective ligand for the opioid κ receptor // *Eur. J. Pharmacol.* — 1985. — Vol. 109, №2. — P. 281-284.
22. **Lee A.Y., Wong T.M.** Naloxone reduces release of creatine kinase in the isolated ischemic rat heart // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* — 1985. — Vol. 179, №2. — P. 219-221.
23. **Lee A.Y.** Stereospecific antiarrhythmic effects of naloxone against myocardial ischaemia and reperfusion in the dog // *Br. J. Pharmacol.* — 1992. — Vol. 107, №4. — P. 1057-1060.
24. **Lee A.Y., Chen Y.T., Lin C.J.** et al. Beneficial effects of the opiate antagonist naloxone on hemodynamics and ventricular function following coronary artery occlusion and reperfusion in the dog // *Proc. Natl. Sci. Coun. Repub. China B.* — 1993. — Vol. 17, №1. — P. 29-34.
25. **Markiewicz W., Finberg J.P.M., Lichtig C.** Morphine increases myocardial infarct size in rats // *Anesth. Analg.* — 1982. — Vol. 61, №10. — P. 843-846.
26. **McIntosh M., Kane K., Parratt J.** Effects of selective opioid receptor agonists and antagonists during myocardial ischaemia // *Eur. J. Pharmacol.* — 1992. — Vol. 210, №1. — P. 37-44.
27. **McPherson B.C., Yao Z.** Morphine mimics preconditioning via free radical signals and mitochondrial K_{ATP} channels in myocytes // *Circulation.* — 2001. — Vol. 103, №2. — P. 290-295.
28. **Miki T., Cohen M.V., Downey J.M.** Opioid receptors contributes to ischemic preconditioning through protein ki-

- nase C activation in rabbits // *Mol. Cell. Biochem.* — 1998. — Vol. 186, №1-2. — P. 3-12.
29. **Murphy D.B., Murphy M.B.** Opioid antagonist modulation of ischaemia-induced ventricular arrhythmias: a peripheral mechanism // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* — 1999. — Vol. 33, №1. — P. 122-125.
30. **Peart J.N., Gross G.J.** Exogenous activation of δ - and κ -opioid receptors affords cardioprotection in isolated murine heart // *Basic Res. Cardiol.* — 2004. — Vol. 99, №1. — P. 29-37.
31. **Portoghese P.S., Garzon-Aburbeh A., Nagase H.** et al. Role of the spacer in conferring kappa opioid receptor selectivity to bivalent ligands related to norbinaltorphimine // *J. Med. Chem.* — 1991. — Vol. 34, №4. — P. 1292-1296.
32. **Romano M.A., McNish R., Seymour E.M.** et al. Differential effects of opioid peptides on myocardial ischemic tolerance // *J. Surg. Res.* — 2004a. — Vol. 119, №1. — P. 46-50.
33. **Romano M.A., Seymour E.M., Berry J.A.** et al. Relative contribution of endogenous opioids to myocardial ischemic tolerance // *J. Surg. Res.* — 2004b. — Vol. 118, №1. — P. 32-37.
34. **Roques B.P., Gacel G., Dauge V.** et al. Novel approaches in the development of new analgesics // *Neurophysiol. Clin.* — 1990. — Vol. 20, №5. — P. 369-387.
35. **Rothman R.B., Bykov V., Xue B.G.** et al. Interaction of opioid peptides and other drugs with multiple kappa receptors in rat and human brain. Evidence for species differences // *Peptides.* — 1992. — Vol. 13, №5. — P. 977-987.
36. **Sander G.E., Giles T.D.** Elevation of arterial blood pressure in conscious dogs by Des-Tyr¹-D-Ala²-leucine-enkephalinamide // *Biochem. Pharmacol.* — 1982a. — Vol. 31, №16. — P. 2699-2700.
37. **Sander G.E., Giles T.D.** Enkephalin analogs and dermorphin in the conscious dog: structure-activity relationships // *Peptides.* — 1982b. — Vol. 3, №6. — P. 1017-1021.
38. **Sander G.E., Lowe R.F., Giles T.D.** The effects of barbiturates upon the hemodynamic responses to intravenous methionine-enkephalin in dogs: modulation by the GABA complex // *Peptides.* — 1986. — Vol. 7, №2. — P. 259-265.
39. **Schiller P.W., Weltrowska G., Nguyen T.M.-D.** et al. TIPP[Ψ]: a highly potent and stable pseudopeptide δ opioid receptor antagonist with extraordinary δ selectivity // *J. Med. Chem.* — 1993. — Vol. 36, №21. — P. 3182-3187.
40. **Sigg D.C., Coles J.A., Oeltgen P.R., Iuzzo P.A.** Role of δ -opioid receptor agonists on infarct size reduction in swine // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2002. — Vol. 282, №6. — P. H1953-H1960.
41. **Sitsapesan R., Parratt J.R.** The effects of drugs interacting with opioid receptors on the early ventricular arrhythmias arising from myocardial ischaemia // *Br. J. Pharmacol.* — 1989. — Vol. 97, №3. — P. 795-800.
42. **Wang G.Y., Wu S., Pei J.M.** et al. κ - but not δ -opioid receptors mediate effects of ischemic preconditioning on both infarct and arrhythmia in rats // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2001. — Vol. 280, №1. — P. H384-H391.
43. **Wang T.L., Huang Y.H., Chang H.** Somatostatin analogue mimics acute ischemic preconditioning in a rat model of myocardial infarction // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* — 2005. — Vol. 5, №4. — P. 327-332.
44. **Wong T.M., Lee A.Y.** Chronic morphine treatment reduces the incidence of ventricular arrhythmias in the isolated rat heart induced by dynorphin1-13 or myocardial ischemia and reperfusion // *Neurosci. Lett.* — 1987. — Vol. 77, №1. — P. 61-65.
45. **Wong T.M., Lee A.Y., Tai K.K.** Effects of drugs interacting with opioid receptors during normal perfusion or ischemia and reperfusion in the isolated rat heart — an attempt to identify cardiac opioid receptor subtype(s) involved in arrhythmogenesis // *J. Mol. Cell. Cardiol.* — 1990. — Vol. 22, №10. — P. 1167-1175.
46. **Wu J.-P., Chen Y.-T., Lee A.Y.-S.** Opioids in myocardial ischemia: potentiating effects of dynorphin on ischemic arrhythmia, bradycardia and cardiogenic shock following coronary artery occlusion in the rat // *Eur. Heart J.* — 1993. — Vol. 14, №9. — P. 1273-1277.
47. **Wu S., Wong M.C., Chen M.** et al. Role of opioid receptors in cardioprotection of cold-restraint stress and morphine // *J. Biomed. Sci.* — 2004. — Vol. 11, №6. — P. 726-731.
48. **Yang C.S., Tsai P.J., Chou S.T.** et al. The role of reactive oxygen species and endogenous opioid peptides in ischemia-induced arrhythmias of isolated rat hearts // *Free Radic. Biol. Med.* — 1995. — Vol. 18, №3. — P. 593-598.
49. **Zhan Z.Y., Lee A.Y., Wong T.M.** Naloxone blocks the cardiac effects of myocardial ischaemia and reperfusion in the rat isolated heart // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* — 1985. — Vol. 12, №4. — P. 373-378.

Поступила 05.07.12

Сведения об авторах:

Маслов Леонид Николаевич — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории экспериментальной кардиологии, ФГБУ НИИ кардиологии СО РАМН

Барзах Ева Иделевна — к.м.н., с.н.с. лаборатория экспериментальной кардиологии, ФГБУ НИИ кардиологии СО РАМН

Лишманов Антон Юрьевич — к.м.н., м.н.с. лаборатория экспериментальной кардиологии, ФГБУ НИИ кардиологии СО РАМН

Горбунов Александр Сергеевич — м.н.с. лаборатория экспериментальной кардиологии, ФГБУ НИИ кардиологии СО РАМН

Цибульников Сергей Юрьевич — м.н.с. лаборатория экспериментальной кардиологии, ФГБУ НИИ кардиологии СО РАМН

Семенцов Андрей Сергеевич — лаборант-исследователь лаборатория экспериментальной кардиологии, ФГБУ НИИ кардиологии СО РАМН

В. Шварц

Синдром хронического воспаления жировой ткани

Клиника реабилитации "Бад Колберг", Parkallee 1, Rehabilitationsklinik Bad Colberg, D – 98663 Bad Colberg, Германия

В работе обсуждается патогенетическая роль хронического воспаления жировой ткани в развитии атеросклероза, сахарного диабета 2-го типа, метаболического синдрома и артериальной гипертензии.

Ключевые слова: хроническое воспаление, жировая ткань, атеросклероз, сахарный диабет 2-го типа, метаболический синдром, артериальная гипертензия

Schwarz V.

The syndrome of chronic inflammation of adipose tissue

Rehabilitationsklinik Bad Colberg, Parkallee 1, D-98663 Bad Colberg, Germany

The pathogenetic role of adipose tissue chronic inflammation syndrome in development of atherosclerosis, type II diabetes, metabolic syndrom and hypertension is being discussed.

Key words: chronic inflammation, adipose tissue, atherosclerosis, type II diabetes, metabolic syndrom, hypertension

Результаты исследований последних лет свидетельствуют о роли хронического воспаления в развитии ведущих заболеваний современности: атеросклероза, сахарного диабета, злокачественных новообразований. Полагают, что именно оно лежит в основе известного из эпидемиологических исследований достоверного учащения сочетания сахарного диабета и артрозов, увеличения частоты атеросклероза при парадонтозе, повышенного риска инфаркта миокарда у больных ревматоидным полиартритом. В клинике и эксперименте убедительно продемонстрирована роль воспаления стенки артерий в патогенезе атеросклероза и связанных с ним инфаркта миокарда и ишемического инсульта.

Особый интерес представляет хроническое воспаление жировой ткани (ВЖТ), рассматриваемое как следствие и причина ожирения и связанных с ним многочисленных заболеваний. ВЖТ характеризуется клеточной инфильтрацией, фиброзом, изменениями микроциркуляции, сдвигом секреции адипокинов и нарушениями метаболизма жировой ткани (ЖТ), а также повышением в крови уровня таких неспецифических маркеров воспаления как С-реактивный белок (С-РБ), фибриноген, лейкоциты, коррелирующих с выраженностью процесса [1]. ВЖТ не имеет клинических проявлений. Его диагностика основывается на основании результатов гистологического исследования биоптата ЖТ. Определение С-РБ и других мар-

керов воспаления позволяет судить о степени выраженности процесса и особенно его динамике, но не причинах. Лишь при исключении других патологических процессов можно с оговорками полагать, что рост С-РБ при ожирении обусловлен ВЖТ.

Морфологические изменения при ВЖТ достаточно типичны и в то же время имеют признаки, присущие воспалению других органов и тканей. Наиболее характерным является инфильтрация ЖТ макрофагами, которые преимущественно локализуются вокруг гипертрофированных и/или погибших адипоцитов. Инфильтрация макрофагами висцерального жира существенно больше, чем подкожного, прямо коррелирует со степенью ожирения и значительно увеличивается в период накопления жира с бурным повышением веса. При этом макрофаги могут составлять до 40% всех клеток ЖТ. Снижение веса сопровождается уменьшением числа макрофагов в ЖТ. При кормлении мышей диетой, индуцирующей ожирение, найдена этапность инфильтрации ЖТ, характерная для любого воспалительного процесса: вначале наблюдается инфильтрация нейтрофилами и Т-лимфоцитами, спустя 3-7 дней — макрофагами.

При ВЖТ замедляется кровоток в ЖТ, увеличивается фенестрация капилляров, что является предпосылкой для повышения проницаемости стенки сосудов. Также выявляется дисфункция эндотелия, сопровождающаяся дилатацией сосудов. Перечисленные нарушения лежат в основе гипоксии ЖТ, закономерно наблюдающейся при ВЖТ.

При ВЖТ, как и при других воспалительных процессах, развивается фиброз. Адипоциты и преадипо-

Для корреспонденции: Шварц Виктор, д-р мед., проф., ведущий врач клиники реабилитации "Бад Кольберг", руководитель отделения "Сахарный диабет и гастроэнтерологические заболевания". E-mail: schwarzmedizin@web.de.

циты под влиянием активированных макрофагов продуцируют компоненты экстрацеллюлярного матрикса, локализующиеся в виде аморфной зоны вокруг адипоцитов и свидетельствующие о повреждении ЖТ. Примечательно, что снижение веса в результате хирургического лечения больных с ожирением приводило к уменьшению системных параметров воспаления и инфильтрации ЖТ макрофагами, но не снижало степень фиброза ЖТ. Подобная ирреверсibilitätность фиброза в определенной степени объясняет безуспешность терапии ожирения у части больных, несмотря на адекватность проводимого лечения.

Локальные и системные патологические расстройства, вызываемые ВЖТ обусловлены в первую очередь внутриклеточными воспалительными изменениями. В клетках ЖТ среди последних наиболее значимы:

- а) активация Inhibitor of kappa B kinase (IKK);
- б) активация c-Jun N-terminal kinase (JNK);
- в) активация ферментов эндоплазматического ретикулаума;
- г) активация протеинкиназы-С (ПК-С);
- д) нарушение соотношения между реактивными формами кислорода и антиокислительными защитными факторами, определяемое как окислительный стресс.

Активация IKK, JNK, ПК-С приводит в цитозоле к высвобождению нуклеарного фактора транскрипции NF-κB (Nuclear factor kappa B), который мигрирует в ядро клетки и стимулирует транскрипцию генов многочисленных регуляторных субстанций, в том числе, — адипокинов, фактора некроза опухоли α (ФНОα), интерлейкинов (ИЛ), хемокинов, молекул адгезивных комплексов, ингибиторов и активаторов апоптоза и др. Механизмы, инициирующие указанные реакции в адипоцитах, окончательно не установлены. Доминирует представление о ведущей роли цитокинов секретирующихся активированными провоспалительными макрофагами ЖТ и, возможно, других веществ. Цитокины, в первую очередь ФНОα, индуцируют в адипоцитах гамму воспалительных сдвигов, что обуславливает продукцию в них цитокинов (в том числе ФНОα). Этот факт послужил основой представления о том, что ВЖТ процесс самоподдерживающийся: однажды инициированный он прогрессирует уже без наличия дополнительных факторов. Можно полагать, что это также одна из причин трудности лечения ожирения.

Важнейшим вопросом обсуждаемой проблемы является значение ВЖТ для организма. Последствия ВЖТ условно можно разделить на локальные и системные. Среди локальных в клинической практике наиболее значимо прогрессирование ожирения, среди системных — развитие таких заболеваний, как атеро-

склероз, сахарный диабет 2 типа (СД2), метаболический синдром (МС), неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), артериальная гипертония, сочетание которых с ожирением хорошо документировано.

Особое место среди последствий ВЖТ занимает инсулинрезистентность (ИР), играющая важную роль в патогенезе всех выше указанных патологических процессов, в первую очередь — СД2. Причинами развития ИР при ВЖТ являются:

- а) изменения секреции адипокинов и цитокинов;
- б) метаболические расстройства;
- в) внутриклеточные воспалительные реакции.

Как известно, физиологическое действие инсулина реализуется путем связывания со специфическим рецептором клеточной мембраны. При этом структура последнего меняется, что ведет к фосфорилированию тирозина на внутриклеточном участке рецептора инсулина, присоединению к нему внутриклеточных адапторпротеинов, в первую очередь — субстрата инсулинового рецептора-1 (IRS-1). На специфических местах IRS-1 фосфорилируется тирозин, что активирует дальнейшие регуляторные сигнальные пути и, в итоге, приводит к реализации инсулинспецифических реакций. Фосфорилирование аминокислоты серина в молекуле IRS-1 инактивирует ее. В результате прерывается внутриклеточный сигнальный путь инсулина и развивается ИР. Фосфорилирование серина активируется ФНОα и ИЛ-6, а также указанными выше элементами внутриклеточной воспалительной реакции: IKK, JNK, ПК-С. Фосфорилирование серина IRS-1 лежит в основе механизма развития ИР и СД-2 не только при воздействии цитокинов, но и множества других, если не большинства факторов, снижающих чувствительность тканей к инсулину. Роль и место изменения секреции адипокинов в развитии ИР и СД2 при ВЖТ описана нами ранее [2]. Важное значение в патогенезе ИР имеют повышение секреции лептина, резистина, лептина, апелина, васпина, обестатина, оментина, ретинол-связывающего протеина-4, адипсина, ингибитора активатора плазминогена-1 (ИАП-1), снижение образования адипонектина, висфатина, наблюдаемые при ВЖТ.

Одним из следствий ВЖТ, имеющих существенное значение для развития указанных выше вторичных заболеваний, являются нарушения жирового метаболизма. Изменения секреции адипокинов и цитокинов при ВЖТ активируют как процессы накопления липидов (причем не только в ЖТ, но и других тканях), так и процессы липолиза. В результате липолиза из депонированных в адипоцитах триглицеридов высвобождаются свободные жирные кислоты (СЖК) и глицерол, уровень которых в крови повышается. СЖК уменьшают усвоение глюкозы мышечными клетками (Randle-механизм) и стимулируют

печеночный глюконеогенез как через энзимную регуляцию, так и через поставку носителя энергии. В жировых и печеночных клетках СЖК ведет к ИР путем активации ПК-С с последующим инактивированием IRS-1. При характерной для ВЖТ гипoadинопектинемии снижается окисление жирных кислот и повышается отложение жира в клетках печени и мышц. Это эктопическое накопление липидов усугубляет ИР. Развитию ИР также способствуют такие участники воспалительной реакции как активация ферментов эндоплазматического ретикулума и окислительного стресса.

Кроме того, цитокины, в частности ФНО α , подавляют гены, вовлеченные в процесс усвоения и депонирования СЖК и глюкозы, а также повышают экспрессию генов, участвующих в транскрипции факторов липо- и адипогенеза. В гепатоцитах ФНО α угнетает экспрессию генов, участвующих в усвоении и метаболизме глюкозы, а также в окислении жирных кислот, и повышает экспрессию генов, регулирующих синтез холестерина и жирных кислот. В результате, при ВЖТ повышается уровень в крови холестерина и триглицеридов.

Перечисленные патологические реакции обуславливают развитие не только ИР, но и СД2. Дополнительным механизмом патогенеза СД2 является развитие дисфункции β -клеток и снижение секреции инсулина. Механизм повреждения β -клеток поджелудочной железы при ВЖТ заключается:

- а) в активации окислительного стресса;
- б) в накоплении в них липидов;
- в) в гипoadинопектинемии.

Особенностью β -клеток является низкая продукция антиокислительных энзимов, вследствие чего в β -клетках накапливаются реактивные формы кислорода, активирующих JNK. Последняя стимулирует фосфорилирование серина в молекуле IRS-1, что ингибирует индуцированную глюкозой секрецию инсулина в β -клетках. Повышение уровня СЖК при СД2 сопровождается отложением липидов в β -клетках с последующим нарушением их функции. Одной из причин снижения секреции инсулина при ВЖТ может быть гипoadинопектинемия. В составе мембран β -клеток имеются рецепторы адипонектина, который стимулирует секрецию инсулина. Следует отметить, что изменения секреции адипокинов и цитокинов реализуют свое диабетогенное действие также другими, независимыми от ВЖТ, путями [2, 3].

ВЖТ способствует развитию атеросклероза [4]. Особое значение при этом придается периваскулярной ЖТ, которая по своим морфологическим и физиологическим характеристикам близка висцеральному жиру. Окружающая артерии ЖТ долгое время рассматривалась как фактор механический, защища-

ющий и поддерживающий сосуд в его ложе. В последние годы найдено, что периваскулярная ЖТ, также как и висцеральный жир, секретирует адипокины и цитокины, проатерогенные хемокины и пептиды, стимулирующие ангиогенез. Эти факторы, действуя паракринным путем, нарушают функцию и структуру сосудистой стенки, включая стимуляцию хронического воспаления, дисрегуляцию сосудистого тонуса, пролиферацию гладкомышечных клеток, активацию неоангиогенеза и, в итоге, ведут к развитию атеросклероза и его осложнений.

Роль измененной секреции адипокинов и цитокинов при ВЖТ в механизме развития атеросклероза описана нами ранее [4]. Эффекты сдвигов секреции адипокинов схематично можно представить следующим образом. Проатерогенные свойства лептина обусловлены тем, что он способствует окислительному стрессу, экспрессии адгезивных молекул, стимулирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных и гладкомышечных клеток, активирует тромбообразование. Резистин повышает в эндотелиальных клетках секрецию адгезивных молекул, вазоконстриктора эндотелин-1, ИАП-1, стимулирует миграцию гладкомышечных клеток. ИАП-1 способствует тромбообразованию путем торможения фибринолиза. ФНО α уменьшает образование оксида азота, что ведет к дилатации сосудов и способствует дисфункции эндотелия. Кроме того, ФНО α стимулирует адгезивные молекулы эндотелия, способствуя проникновению воспалительных клеток в сосудистую стенку. Адипонектин обладает антиатерогенным действием, ингибируя продукцию проатерогенных цитокинов, адгезию воспалительных клеток к эндотелию, пролиферацию гладкомышечных клеток и превращение макрофагов в пенистые клетки. Наконец, адипокины и цитокины реализуют свое атерогенное действие за счет стимуляции метаболических расстройств и ИР.

ИР, обуславливая дислипидемию, гипергликемию и артериальную гипертонию, имеет в развитии атеросклероза при ВЖТ самостоятельное значение. Для ИР характерно повышение триглицеридов и снижение ЛПВП в крови. Задолго до развития нарушения обмена глюкозы при ИР повышается уровень СЖК, что обусловлено уменьшением угнетения липолиза инсулином, а также нарушением накопления жирных кислот в адипоцитах. Увеличение поступления липидов из различных источников (СЖК из жировой ткани; эндоцитоз липопротеинов, богатых триглицеридами; новообразование липидов при липогенезе) ведет к стабилизации аполипопротеина В (апоВ), наиболее существенного липопротеина в составе ЛПОНП, способствующему атеросклерозу. При ИР также уменьшена активность липопротеинлипазы, основного медиатора клиренса ЛПОНП. Многие

лица с ИР имеют повышенный уровень глюкозы, не достигающий однако показателей, характерных для диабета, но достаточный для развития атеросклероза. Эпидемиологические наблюдения показали прямую корреляцию между риском развития сердечно-сосудистых заболеваний и гликемией, начиная с уровня 3,9 ммоль/л и HbA1c — с 5%.

Наконец, определенную роль в развитии атеросклероза играет повышение артериального давления, наблюдаемое при ВЖТ. Артериальная гипертензия при ВЖТ объясняется метаболическими сдвигами, изменением секреции адипокинов, ИР, нейро-эндокринными нарушениями. В частности, инфузия жирных кислот в портальную вену ведет к активации симпатической нервной системы и повышает артериальное давление у грызунов. Кроме того, артериальное давление повышают характерные для ВЖТ гипoadипонектинемия и гиперлептинемия.

Анализ результатов клинических и экспериментальных исследований позволяет заключить, что атерогенное действие ВЖТ реализуется за счет трех механизмов:

- 1) путем распространения воспалительной реакции на интиму сосудов (по-видимому, ведущее значение при этом принадлежит воспалению периваскулярной ЖТ);

- 2) путем изменения секреции адипокинов, обуславливающей дисфункцию эндотелия, гипертензию, протромботический эффект, проатерогенный липидный профиль;

- 3) путем развития ИР.

По-видимому, патогенетическое значение ВЖТ заключается, в первую очередь, в развитии эндотелиальной дисфункции, инициирующей атерогенез. Несомненно, что и на последующих этапах атеросклероза, вплоть до развития атеросклеротической бляшки и нарушения ее целостности, изменения секреции адипокинов и цитокинов при ВЖТ играют определенную роль: способствуют накоплению липидов в интиме сосудов, образованию пенистых клеток, миграции и увеличению количества гладкомышечных клеток, тромбообразованию.

Синдром неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) описан относительно недавно. Он отличается накоплением липидов в печеночных клетках, перипортальной инфильтрацией лейкоцитами и лимфоцитами, тенденцией к развитию цирроза печени. Его патогенез связан с метаболическими расстройствами, ассоциированными с ИР. Проведенные исследования демонстрируют взаимосвязь НАСГ и ВЖТ. Однако остается неясным является ли их частое сочетание следствием общих патогенетических (и этиологических) механизмов, или же ВЖТ обуславливает развитие НАСГ.

Патогенез ВЖТ остается во многом неясным. Связь выраженности ВЖТ со степенью ожирения указывает на возможную роль метаболических сдвигов. С другой стороны причиной воспалительной реакции может быть изменение секреции адипокинов, цитокинов, хемокинов адипоцитами при ожирении. Особый интерес для понимания патогенеза ВЖТ представляют недавно полученные данные о участии в жировых клетках компонентов иммунитета и их физиологической роли [5]. В составе мембран жировых клеток установлено наличие рецепторов врожденного иммунитета — Toll-подобных рецепторов (Toll-like receptors — TLRs), в первую очередь — TLR4. TLRs распознают молекулярные компоненты бактерий, вирусов, грибов и др. патогенов и активируют провоспалительные сигнальные пути в ответ на микробные патогены. Специфическим лигандом TLR4 является липополисахарид (ЛПС) из стенки грам-негативных бактерий. У здорового человека источником ЛПС являются микроорганизмы, населяющие кишечник. Активация TLR4 стимулирует ряд внутриклеточных киназ, что, в итоге, обеспечивает транслокацию нуклеарного фактора NF-κB в ядро клетки с последующей стимуляцией транскрипции многих провоспалительных генов, кодирующих синтез воспалительных регуляторных субстанций, включая цитокины, хемокины, адипокины. В частности, стимуляция TLR4 изолированных адипоцитов повышала секрецию ИЛ-6, ФНОα, резистина, снижала уровень адипонектина. Совокупность этих реакций обуславливает развитие ИР, причем не только в адипоцитах, но и гепатоцитах и мышечных клетках. Активация TLRs также усиливает липолиз. Следовательно, активация TLRs вызывает в ЖТ комплекс изменений, характерный для ВЖТ. В исследованиях грызунов установлено, что наличие TLR4 является необходимым условием инфильтрации ЖТ макрофагами, т.е. условием развития ВЖТ.

По неуставленным пока причинам прием пищи с высоким содержанием жира повышает уровень ЛПС в крови в два-три раза. Высокожировая диета, ведущая к ожирению, активирует внутриклеточную провоспалительную реакцию, вызывает изменение секреции адипокинов и цитокинов, т.е. сдвиги, аналогичные тем, которые инициируются стимуляцией TLR4. Как повышение уровня ЛПС, так и высокожировая диета ведут к ВЖТ. Косвенно ведущую роль ЛПС подчеркивает тот факт, что при кормлении высококалорийной пищей грызунов, выращенных в стерильных условиях и не имеющих кишечной флоры, ожирение не развивается.

Принципиально важным для понимания патогенеза ВЖТ является факт стимуляции TLR4 насыщенными жирными кислотами, как экзогенными, посту-

пившими с пищей, так и эндогенными, высвобождающимися из гепатоцитов и адипоцитов. Примечательно, что ненасыщенные жирные кислоты TLR4 стимулировать не способны. Значение стимуляции адипоцитов лигандами TLRs — ЛПС и насыщенными жирными кислотами — описано нами ранее [5] и сводится к следующему. Компоненты микроорганизмов, внедрившиеся в организм, стимулируют TLRs и вызывают каскад вышеописанных внутриклеточных реакций, в итоге — ИР и липолиз. В результате повышаются уровень гликемии и липидемии, в том числе насыщенных жирных кислот. Последние, в свою очередь, оказывают дополнительное стимулирующее действие на TLRs. Процесс становится самоподдерживающимся. В результате стимуляции TLRs компонентами микроорганизмов из адипоцитов и гепатоцитов высвобождаются глюкоза и липиды, которые в качестве энергетических субстратов обеспечивают деятельность клеток иммунной системы и тем самым элиминацию инфекционного начала. На последующих этапах, после элиминации микроорганизмов, TLRs активируют насыщенные жирные кислоты, что также ведет к повышенному выделению глюкозы и липидов. По-видимому, этот механизм выработался в ходе эволюции как для защиты от инфекции, так и для обеспечения адекватных постинфекционных восстановительных процессов. Поэтому не удивительно, что метаболизм и иммунитет столь тесно связаны, причем не только функционально, но и морфологически.

Описанная физиологическая реакция может приобрести черты патологического процесса и обусловить развитие различных заболеваний. Одной из наиболее важных причин нарушения указанной схемы реакции является положительный энергетический баланс, ведущий к аккумуляции жиров и повышению уровня насыщенных жирных кислот в крови. В результате недостаточной физической активности и, особенно, избыточном питании у современного человека возникает непредусмотренное эволюцией состояние, когда к поступившим с пищей глюкозе и липидам присоединяются эти же субстанции из печени и адипоцитов вследствие активации TLRs насыщенными жирными кислотами и развитию ИР жировых, печеночных и мышечных клеток. В условиях неостребованности энергетических субстратов стимуляция TLRs нарастает, развивается дисфункция иммунной системы, локальные и системные процессы воспаления. Надо полагать, что именно в этом заключается ключевой механизм развития ВЖТ.

Внедрение ряда микроорганизмов может усугублять эти реакции. Накопленные данные указывают на определенное сходство действия микроорганизмов и избытка пищи: оба фактора активируют врожденную иммунную систему, TLRs, повышают выделение

энергетических субстратов и вызывают воспалительный процесс. При инфекции эти реакции являются компонентом защиты организма и обеспечивают его выживание. При переизбытке эти же реакции неадекватны и ведут к развитию заболеваний, укорачивающих жизнь индивидуума. С нашей точки зрения, нельзя утверждать, что ожирение есть результат инфекции. Однако то обстоятельство, что насыщенные жирные кислоты и компоненты структур микроорганизмов являются лигандами рецепторов врожденной иммунной системы и вызывают в них идентичные физиологические и патофизиологические реакции, свидетельствует о возможности кумулятивного действия диетических излишеств и некоторых видов микроорганизмов.

Таким образом, ведущим патогенетическим механизмом ВЖТ следует признать избыточное поступление энергетических субстратов с пищей, в первую очередь — насыщенных жирных кислот. Активируя рецепторы врожденного иммунитета, локализованные на адипоцитах, насыщенные жирные кислоты инициируют каскад внутриклеточных воспалительных реакций, ведущих к стимуляции секреции цитокинов и существенным изменениям продукции адипокинов. Результатом является ВЖТ, предопределяющее прогрессирование ожирения, развитие ИР, дислипидемии, СД2, атеросклероза, артериальной гипертензии, НАСГ.

Клинические исследования, имеющие целью профилактику и лечение ВЖТ, пока не проводились. Однако результаты исследования больных, страдающих заболеваниями, определяемых как следствие ВЖТ, позволяют косвенно судить об эффективности различных средств. Ведущая роль избытка насыщенных жирных кислот в патогенезе ВЖТ обосновывает их диетическое ограничение в качестве профилактического и лечебного средства. Это ограничение наиболее последовательно претворяет в жизнь средиземноморская диета, предусматривающая уменьшения потребления животных жиров и повышение количества растительных жиров (оливкового масла), продуктов моря и продуктов с высоким содержанием балластных веществ. Доказано, что строгое соблюдение средиземноморской диеты эффективно при ожирении, МС, СД2, атеросклерозе и НАСГ, т.е. заболеваниях, описанных как последствия ВЖТ.

Многочисленными клиническими и экспериментальными исследованиями продемонстрировано снижение выраженности ВЖТ при уменьшении ожирения. Метод достижения снижения массы тела при этом значения не имел. Примечательно, что липосакция, уменьшавшая массу подкожножировой ткани, на параметры ВЖТ не влияла, в то время как бариатрические операции (уменьшение объема желудка, гаст-

роеональное шунтирование и т.п.), уменьшавшие массу висцерального жира, вели к достоверному снижению количества макрофагов в ЖТ и уровня С-РБ в крови. Исходя из этого, предупреждение и уменьшение ожирения следует признать методом профилактики и лечения ВЖТ.

Природа описываемого синдрома определяет интерес к эффективности применения противовоспалительных средств. Еще в 1876 г. Ebstein описал исчезновение симптомов сахарного диабета при применении больших доз салицилата натрия. Современными методами подтверждено уменьшение ИР и снижение гипергликемии под действием салицилатов и показано, что эти эффекты обусловлены угнетением фактора транскрипции NF-κB. Особенно убедительно значение воспаления доказывается фактом снижения гипергликемии у лиц СД2 при ингибировании ИЛ-1 человеческим рекомбинантом этого воспалительного цитокина. Аналогичные эффекты наблюдали при применении антител к ФНОα (напр., инфликсимаба). В силу необходимости больших доз и выраженных побочных эффектов противовоспалительные препараты не нашли практического применения при лечении СД2 и других последствий ВЖТ.

Особый интерес вызывает противовоспалительная эффективность препаратов, давно и широко использующихся для лечения СД2 и атеросклероза. Оказалось, что метформин, глитазоны (пиоглитазон, розиглитазон), производные сульфонилмочевины, статины снижают уровень ИЛ-6, ФНОα, С-РБ и лейкоцитов в крови больных, угнетают активность окислительного стресса, NF-κB и внутриклеточных киназ у экспериментальных животных. Обсуждается как не-

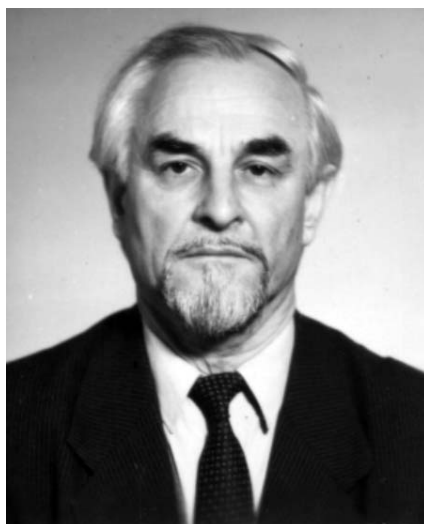
посредственное противовоспалительное действие этих препаратов, так и опосредованное — за счет улучшения углеводного и жирового обмена. Действие этих препаратов на морфологические параметры ВЖТ практически не исследовалось.

Таким образом, исследования последних лет выявили наличие хронического ВЖТ и показали, что оно ответственно за наиболее важные и известные заболевания, ассоциированных с ожирением. Патогенетическое значение ВЖТ для развития основных заболеваний современности — атеросклероза, МС, СД2, ожирения, артериальной гипертензии и, возможно, злокачественных новообразований, бронхиальной астмы, аутоиммунных заболеваний, обосновывает его выделение как особого патологического процесса, который можно обозначить как синдром хронического воспаления жировой ткани.

Список литературы

1. **Шварц В.** Воспаление жировой ткани (часть 1). Морфологические и функциональные проявления // Проблемы эндокринологии. — 2009. — Т. 55, №4. — С. 44—49.
2. **Шварц В.** Воспаление как фактор патогенеза инсулинрезистентности и сахарного диабета 2-го типа // Терапевтический архив. — 2009. — №10. — С. 74—80.
3. **Шварц В.** Жировая ткань как эндокринный орган // Проблемы эндокринологии. — 2009. — Т. 55, №1. — С. 38—44.
4. **Шварц В.** Воспаление жировой ткани и атеросклероз // Кардиология. — 2009. — Т. 49, №12. — С. 80—86.
5. **Шварц В.** Жировая ткань как орган иммунной системы // Цитокины и воспаление. — 2009. — Т. 8, №4. — С. 3—10.

Еникеев Дамир Ахметович (к 75-летию со дня рождения)



1 января 2014 года исполнилось 75 лет известному российскому патофизиологу, заслуженному деятелю науки РБ, доктору медицинских наук, профессору Дамиру Ахметовичу Еникееву.

Д.А. Еникеев окончил Башкирский государственный медицинский институт, лечебный факультет, с отличием (1963). Доктор медицинских наук (1988), профессор (1989), действительный член 4-х общественных академий (РАЕН, ЕАЕН, МАНВШ, МААНОИ).

Д.А. Еникеев является высококвалифицированным педагогом и одним из ведущих учёных патофизиологов-реаниматологов РБ и РФ с широким кругозором и большими организаторскими способностями. Руководимая им кафедра является коллективом с высоким уровнем преподавания. Под его руководством на кафедре создана галерея учебных стендов и 10 тематических классов-модулей по патофизиологии экстремальных и терминальных состояний — всего более 450, получившие высокую оценку со стороны Госинспекции вузов РФ.

В течение 7 лет (1988—1995) Д.А. Еникеев работал деканом лечебного факультета. Имеет высшую квалификационную категорию врача-кардиолога.

Ему принадлежит более 870 печатных научных работ, среди которых 30 монографий, более 400 журнальных статей, 45 авторских свидетельств и патентов СССР, РФ и Украины на изобретения и полезные модели, 24 рационализаторских предложения, 160 работ в международной печати.

Основные работы посвящены изучению:

- патофизиологических закономерностей взаимодействия иммунитета, аллергии и реанимации в сравнительно-эволюционном аспекте;
- исследованию органа зрения и ЦНС при травме, гипоксии, белковой сенсibilизации, смертельной кровопотере;
- исследованию патогенеза нарушений при алкогольной коме, отравлениях ФОВ и действии экотоксикантов.

Научная школа проф. Д.А. Еникеева (13 докторских и 25 кандидатских, выполняются 3 докторские и 4 кандидатские диссертации) является «башкирской» ветвью известной во всём мире научной школы основателя современной реаниматологии, дважды лауреата Государственной премии СССР, академика РАМН, профессора Владимира Александровича Неговского.

Д.А. Еникеев участвовал в работе международных конгрессов и симпозиумов в качестве члена оргкомитета, сопредседателя секции, докладчика.

Д.А. Еникеев — член Международного общества патофизиологов, член правления Всесоюзного (Всероссийского) общества патофизиологов, председатель Башкирского республиканского регионального общества патофизиологов, член редсоветов журналов «Патологическая физиология и экспериментальная терапия», «Клиническая медицина и патофизиология», «Медицинский вестник Башкортостана». Он является действительным членом Берлинского и Итальянского (Римского) научного медицинского

общества, вице-президентом Европейской академии естественных наук по Уральскому региону.

Д.А. Еникеев награжден знаками «Изобретатель СССР» (1985), «Заслуженный деятель науки Башкирской АССР» (1993); почетным знаком РАЕН, именной серебряной медалью Международного биографического общества (Англия, Кембридж), дипломом и знаком РАЕН «Золотая кафедра России» за заслуги в области развития отечественного образования.

За вклад в развитие медицины и здравоохранения проф. Д.А. Еникеев награжден высшей наградой РАМН по патофизиологии медалью им. акад. А.Д. Сперанского «За большой вклад в развитие отечественной патофизиологии» (2007), почетной и юбилейной золотыми медалями ЕАЕН им. акад. В.А. Неговского «За особые заслуги в медицине критических состояний» (2006, 2009), золотой медалью и дипломом Европейского качества.

Д.А. Еникеев — прекрасный спортсмен (кандидат в мастера спорта по настольному теннису, имеет

разряды по волейболу, баскетболу, легкой атлетике, шахматам, шашкам.

Д.А. Еникеев пользуется большим и заслуженным авторитетом среди коллег — патофизиологов и реаниматологов.

Желаем глубокоуважаемому юбиляру доброго здоровья, долгих лет жизни и дальнейших творческих успехов.

Ректорат Башкирского государственного медицинского университета

Башкирское отделение Всероссийского общества патофизиологов

Кафедра патофизиологии БГМУ

Редколлегия журнала «Патологическая физиология и экспериментальная терапия»