

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.jpvet.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 рецензируе-
мых научных журналов и изданий,
рекомендованных ВАК России для пуб-
ликации значимых результатов диссертаци-
ций на соискание ученой степени докто-
ра и кандидата наук.

ИФРИНЦ 0,413

Журнал «Патологическая физиология и
экспериментальная терапия» индексиру-
ется 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

Журнал включен в базу данных Scopus
Подписные индексы
по каталогу агентства «Роспечать»:
для индивидуальных подписчиков **71456**
для предприятий и организаций **72151**

ISSN 0031-2991
Патологическая физиология и
экспериментальная терапия.
2014. Том 58. №3. 1—104.

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

Тираж 300 экз.
© ООО Издательство «Гениус Медиа», 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.*

№3, 2014
ИЮЛЬ—СЕНТЯБРЬ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор Б.Б. Мороз

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

Редакционный совет

Ю.В. Балякин (Москва), Ю.Ю. Бяловский (Рязань),
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)

125315, Moscow, Baltiyskaya str., 8

Home page: www.jpvet.net
E-mail: path.physiol@yandex.ru

Publisher:
Genius Media Publishing, Ltd.
Moscow
e-mail: genius-media@mail.ru

THE INSTITUTE OF GENERAL PATHOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY

PATHOLOGICAL PHYSIOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPY

Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya

*Quarterly reviewed science and practical journal
Published since 1957*

Vol.58, №3, 2014

July—September

Editor in chief B.B. Moroz

Assistant editors in chief:

I.S. Gushchin, V.K. Reshetnyak

Executive editor, scientific editor: N.S. Gourko

Members of editorial board:

Yu.V. Archipenko, E.I. Astashkin, S.V. Grachev,
T.A. Guskova, A.V. Efremov, V.B. Koshelev,
N.A. Krupina, A.A. Kubatiev, P.F. Litvitskiy,
V.V. Novitskiy, Yu.A. Petrovich, G.V. Poryadin,
S.A. Seleznev, V.A. Frolov

Staff

Yu.V. Balyakin (Moskva), Yu.Yu. Byalovskiy (Ryazan),
F. Downey (USA), V.T. Dolgikh (Omsk), A.M. Dygay (Tomsk),
A.Ya. Evtushenko (Kemerovo), D.A. Enikeev (Ufa),
V.P. Kulikov (Barnaul), V.P. Mikhailov (Yaroslavl),
V.G. Ovsyannikov (Rostov-na-Donu), S.N. Orlov (Moskva),
N.N. Petrishchev (Sankt-Peterburg), L.A. Severyanova
(Kursk), S.A. Khachatryan (Erevan), V. Shvarz (Germany),
A.P. Yastrebov (Ekaterinburg)

ISSN 0031-2991

Pathological physiology
and experimental therapy
2014. Vol. 58; 3: 1–104.

© Genius Media Publishing, Ltd., 2014.

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Кузнецова Л.В., Карпова М.Н., Зинковский К.А., Клишина Н.В.** Влияние цитиколина на развитие хронической эпилептизации мозга (пентилентетразолового киндлинга) и острую судорожную реакцию мышей C57Bl/6, подвергшихся киндлингу. 4
- Кирова Ю.И., Шакова Ф.М., Германова Э.Л., Пальцын А.А., Романова Г.А., Рыбникова Е.А., Лукьянова Л.Д.** Ранние изменения экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора-1 α (HIF-1 α) в неокортексе крыс с разной толерантностью к острой гипоксии, перенесших фокальный ишемический инсульт префронтальной коры. 9
- Алчинова И.Б., Архипова Е.Н., Медведева Ю.С., Ежова О.А., Черепов А.Б., Карганов М.Ю.** Оценка активности в составе сыворотки при астме: моделирование на животных, клиника и мониторинговые исследования. 17
- Колесникова Л.И., Мадаева И.М., Семёнова Н.В., Гребенкина Л.А., Даренская М.А.** Оценка активности процессов перекисного окисления липидов у мужчин с obstructивными нарушениями дыхания во время сна в разных возрастных группах. 26
- Арокина Н.К., Иванов К.П.** Восстановление респираторной функции организма после холодового угнетения без отогревания. 32
- Лебедева М.А., Карганов М.Ю., Козлова Ю.А., Готовцева Г.Н., Тумуров Д.А., Гудкова А.А., Гехт А.Б.** Роль вегетативной дисфункции в патогенезе синдрома раздраженного кишечника. 37
- Свешников Д.С., Торшин В.И., Смирнов В.М., Кучук А.В., Мясников И.Л.** Значение различных серотонинорецепторов в регуляции моторики желудочно-кишечного тракта. 45
- Гребнев Д.Ю.** Возможность использования сочетанной трансплантации стволовых клеток для активации гемопоэза у старых и зрелых лабораторных животных в условиях воздействия ионизирующего излучения. 52
- Вахнин В.А., Брюхин Г.В.** Когнитивные расстройства и повышенная свободнорадикальная активность мозга потомства крыс-самок с экспериментальной хронической алкогольной патологией печени. 58
- Житков М.Ю., Орлов А.А.** Влияние ионов кальция на скорость адсорбции щелочной фосфатазы и некоторых белков из сыворотки крови на гидроксиапатите. 63
- Тебллова Л.М., Гуревич К.Г.** Остеоиммунология и пародонтит. 67

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Мартынова Е.А., Баранов В.И.** Активация перитонеальных нейтрофилов мышей при введении наночастиц карбида вольфрама *in vivo*. 73

ОБЗОРЫ

- Комиссарова С.В., Дубровин И.П., Пальцын А.А.** Регенерация нейронов. 76
- Селиванова А.В., Марченков Ю.В.** Патологические аспекты изменения обмена веществ у пациентов с тяжелой механической травмой. 88

ЛЕКЦИИ

- Игнатьева Г.А.** Теории иммунитета: история идей и их развитие. 93

МЕТОДИКА

- Султанов Д.В., Хугаева В.К.** Метод прижизненного изучения микроциркуляции в легких у крыс с помощью модифицированной камеры. 102

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- Kuznetsova L.V., Karpova M.N., Zinkovsky K.A., Klishina N.V.** Effect of citicoline on the development of chronic epileptization of the brain (pentylentetrazole kindling) and acute seizures reaction of kindled mice C57Bl/6
- Kirova Yu.I., Shakova F.M., Germanova E.L., Paltsyn A.A., Romanova G.A., Rybnikova Ye.A., Lukyanova L.D.** Urgent changes in the expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) in the neocortex of rats with different tolerance to acute hypoxia underwent focal ischemic stroke prefrontal cortex
- Alchinova I.B., Arkhipova E.N., Medvedeva Yu.S., Ezhova O.A., Cherepov A.B., Karganov M.Yu.** Shifts in subcellular content of blood serum and urine at asthma: animal model, clinic and monitoring data
- Kolesnikova L.I., Madaeva I.M., Semenova N.V., Grebenkina L.A., Darenskaya M.A.** Evaluate the activity of lipid peroxidation in men with obstructive breathing disorders during sleep in different age groups
- Arokina N.K., Ivanov K.P.** Restoration of respiratory function of an organism after cold oppressions without warming
- Lebedeva M.A., Karganov M.Yu., Kozlova Y.A., Gotovtceva G.N., Tumurov D.A., Gudkova A.A., Guekht A.B.** The role of autonomic dysfunction in pathogenesis of irritable bowel syndrome
- Sveshnikov D.S., Torshin V.I., Smirnov V.M., Kuchuk A.V., Myasnikov I.L.** The significance of different 5-HT-receptors in regulation of gastrointestinal motility
- Grebnev D.U.** The opportunity to use combined stem cells transplantation for haemopoiesis activation in the old and mature laboratory animals under the conditions of ionizing radiation
- Vakhnin V.A., Brukhin G.V.** The cognitive disorders and raised free-radical activity of a brain of posterity of rats-females with experimental chronic alcoholic pathology of a liver
- Zhitkov M.Yu., Orlov A.A.** Influence of calcium and phosphate ions on the adsorption rate of alkaline phosphatase and some of serum proteins on the hydroxyapatite
- Tebloeva L.M., Gurevich K.G.** Osteoimmunology and Periodontitis

BRIEF REPORTS

- Martynova E.A., Baranov V.I.** Murine peritoneal neutrophil activation upon tungsten nanoparticles exposure *in vivo*

REVIEWS

- Komissarova S.V., Dubrovin I.P., Paltsyn A.A.** Regeneration of neurons
- Selivanova A.V., Marchenkov Yu.V.** Pathophysiological aspects of changing of metabolism in patients with severe mechanical trauma

LECTURES

- Ignatieva G.A.** Theories of immunity: history and development of ideas

METHODS

- Sultanov D.V., Khugaeva V.K.** Method *in vivo* study of the microcirculation in rat lung using a modified technique

© Коллектив авторов, 2014
УДК 616-092.616.9-76.29.51

Кузнецова Л.В.¹, Карпова М.Н.¹, Зиньковский К.А.², Клишина Н.В.¹

Влияние цитиколина на развитие хронической эпилептизации мозга (пентилентетразолового киндлинга) и острую судорожную реакцию мышей C57Bl/6, подвергшихся киндлингу

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

² — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Тверская государственная медицинская академия Минздрава России, 170100, Тверь, ул. Советская, 4

В экспериментах на мышах C57Bl/6 изучали влияние цитиколина (500 мг/кг, в/бр.) на развитие хронической эпилептизации мозга — пентилентетразолового (ПТЗ) киндлинга (30 мг/кг, в/бр. в течение 24 сут.) и на острые генерализованные судороги (в/в, 1% ПТЗ со скоростью 0,01 мл/с). Показано, что ежедневное введение цитиколина за час до введения ПТЗ не влияло на развитие хронической эпилептизации мозга — ПТЗ киндлинга (латентный период появления судорог и их тяжесть). Однако цитиколин оказывал антиконвульсивное действие на острые судороги у мышей, подвергшихся киндлингу. У животных с повышенной в результате киндлинга судорожной активностью мозга и тяжестью судорог 2—3 балла введение цитиколина после 14 сут. киндлинга оказывало противосудорожное действие, повышая порог клонической фазы судорог. Введение цитиколина в течение 24 сут. животным с тяжестью судорог 3—5 баллов приводило к повышению судорожного порога, необходимого как для появления клонических судорог, так и тонической фазы судорог с летальным исходом. Следовательно, противосудорожный эффект цитиколина более выражен при его длительном применении.

Ключевые слова: цитиколин, судороги, киндлинг, пентилентетразол

Kuznetsova L.V.¹, Karpova M.N.¹, Zinkovsky K.A.², Klishina N.V.¹

Effect of citicoline on the development of chronic epileptization of the brain (pentylentetrazole kindling) and acute seizures reaction of kindled mice C57Bl/6

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

² — Department of psychiatry, narcology, Tver State Medical Academy, Russia, 170100, Tver, Sovetskaya str., 4

In experiments on mice C57Bl/6 was studied effects of citicoline (500 mg/kg, i.p.) on development of chronically epileptization of the brain — pentylentetrazole (PTZ) kindling (30 mg/kg PTZ, i.p. during 24 days) and on acute generalized seizures (i.v., 1% solution of PTZ with the speed of 0,01 ml/s). It was shown that daily injection of citicoline an hour before the introduction of PTZ had no effect on development of chronically epileptization of the brain — PTZ-kindling (the latency of seizures appearance and their severity). However, citicoline posses anticonvulsive effects on acute seizures in kindled mice. In animals with increased seizure susceptibility of the brain caused by kindling and severity of seizures 2—3 points injection citicoline after 14 days of kindling had anticonvulsive effect, increasing the threshold clonic seizures. Injection of citicoline during 24 days of kindled animals and severity of seizures 3—5 points caused the increase of thresholds as clonic and tonic phase of seizures with lethal outcome. Thus, the anticonvulsant effect of citicoline more pronounced in the long-term use.

Key words: citicoline, seizures, kindling, pentylentetrazole

Эпилепсия — сложное по этиологии и патогенезу нервно-психическое заболевание — имеет хронически-прогредиентное течение и характеризуется полиморфностью как пароксизмальных проявлений, так и

нарушений психической деятельности. Классические и новые противоэпилептические лекарственные средства могут купировать повышенную судорожную активность мозга, но, как правило, не обладают защитными свойствами в отношении нейродегенерации. Кроме того, действие большинства противоэпилептических препаратов сопровождается рядом побочных эффектов, к числу которых можно отнести нарушение

Для корреспонденции: Карпова Маргарита Николаевна (Karpova Margarita Nikolaevna), д.б.н., главный научный сотрудник лаб. общей патологии нервной системы ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН; e-mail: karpovamn@gmail.com

основных когнитивных функций — внимания, памяти, восприятия и др. В связи с изложенным представлялось целесообразным исследовать влияние цитиколина — аналога эндогенного цитиколина, который в настоящее время широко применяется в лечении когнитивных, чувствительных, двигательных неврологических нарушений дегенеративной и сосудистой этиологии, и обладает нейрорегенеративными и нейропротективными свойствами [1—5].

Цель исследования — изучение влияния цитиколина на развитие хронической эпилептизации мозга и острые генерализованные судороги у животных с повышенной в результате киндлинга судорожной активностью мозга.

Методика

Эксперименты выполнены на мышах самцах линии C57Bl/6 ($n = 120$) с начальной массой 18—24 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пищи. Все процедуры и эксперименты на животных проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (Приказ Министерства здравоохранения РФ №267 от 19.06.2003 г.).

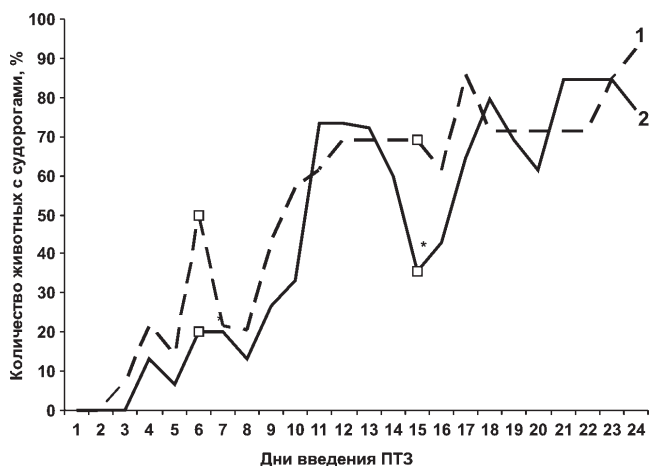
Проведено 5 серий опытов. Во всех сериях цитиколин (Цераксон, «Nicomed Ferrer Internacional, S.A.») вводили внутривентрикулярно в дозе 500 мг/кг за час до введения (киндинг) и титрования (острые судороги) конвульсанта пентилентетразола (ПТЭ).

В 1-й серии опытов ($n = 30$) изучали возможное влияние цитиколина на развитие хронической эпилептизации мозга — киндинга, который осуществляли путем ежедневного внутривентрикулярного введения ПТЭ в субконвульсивной дозе 30 мг/кг животным в течение 24 сут. Как известно, феномен киндинга заключается в том, что повторные введения субсудорожных доз конвульсанта вызывают постепенное повышение судорожной активности мозга, проявляющейся в возникновении судорог и нарастанием их тяжести при последующих введениях конвульсанта. Феноменологически киндинг проявляется в снижении судорожного порога в ответ на тестирующую дозу конвульсанта. Ежедневно у каждого животного оценивали тяжесть судорожной реакции в баллах по 5-балльной шкале [6, 7]. Судорожную реакцию в ответ на введение конвульсанта оценивали по усредненному баллу у животных каждой группы. Опытным животным этой серии цитиколин вводили внутривентрикулярно перед каждой инъекцией ПТЭ в течение 24 сут. Контрольным животным в аналогичных условиях опыта в том же объеме вводили физиологический раствор.

Во 2—5-й сериях опытов на модели острой генерализованной эпилептической активности определяли порог судорожной реакции мышей, подвергшихся ПТЭ киндлингу. С этой целью животным внутривенно вводили 1%-ный раствор ПТЭ со скоростью 0,01 мл/с и регистрировали пороги клонических судорог и тонической фазы судорог с летальным исходом. Пороговую дозу ПТЭ вычисляли для каждого животного в мг/кг. Величину порогов судорожной реакции мышей определяли через сутки после 14-й и 24-й инъекции ПТЭ.

Через сутки после 14-й и 24-й инъекции ПТЭ опытным животным 2-й и 3-й серий цитиколин вводили за час до титрования ПТЭ однократно, а опытным мышам 4-й и 5-й серий — ежедневно в течение 14 и 24 сут. и за час до титрования ПТЭ. Контрольным животным этих серий в тех же условиях опыта и в том же объеме вводили физиологический раствор.

Статистическую обработку данных осуществляли по алгоритмам программы «IBM SPSS Statistic 20». Проводили предварительную проверку предположения о нормальном характере распределения эмпирических данных в каждой экспериментальной группе по тестам Колмогорова—Смирнова. Оценку значимости показателей и различий рассматриваемых выборок проводили по t-критерию Стьюдента. Частоту встречаемости признака оценивали с помощью точного метода Фишера. Для всех количественных признаков в сравниваемых группах производилась оценка среднеарифметических и среднеквадратических (стандартных) ошибок среднего.



Влияние ежедневного введения цитиколина на развитие хронической эпилептизации мозга мышей C57Bl/6.

По оси ординат — количество животных с судорогами, %; по оси абсцисс — дни введения ПТЭ.

1 — контроль — ежедневное введение физиологического раствора за час до инъекции ПТЭ; 2 — опыт — ежедневное введение цитиколина за час до инъекции ПТЭ.

Результаты и обсуждение

Оценка влияния цитиколина на развитие хронической эпилептизации мозга (1-я серия) показало, что судороги появлялись на 4-е сут. киндлинга у 13,30% животных; в контроле — на 3-и сут. у 7,14% животных, то есть введение цитиколина существенно не влияло на латентный период появления судорог. Дальнейшее наблюдение показало, что цитиколин не оказывал влияния на динамику развития киндлинга и тяжесть судорог. Однако следует отметить тенденцию к уменьшению числа животных с судорогами у животных с введением цитиколина: на 6-е и 15-е сут. киндлинга число животных с судорогами в этой группе было статистически значимо меньше (рисунок).

Во 2-й серии опытов после 14 сут. киндлинга однократное введение цитиколина за час до титрования ПТЗ животным, у которых тяжесть судорог в этот период составила 2—3 балла, приводило, к повышению судорожного порога (увеличению дозы ПТЗ),

необходимого для появления клонической фазы судорог на 19,29% по сравнению с контролем и не оказывало влияние на тоническую фазу судорог (табл. 1).

В 3-й серии опытов после 24 сут. киндлинга однократное введение цитиколина за час до титрования ПТЗ животным, у которых тяжесть судорог в этот период составила 3—5 баллов, оказалось не эффективным (табл. 1).

Таким образом, однократное введение цитиколина оказывает противосудорожное действие, повышая порог клонической фазы судорог у животных с повышенной в результате киндлинга, судорожной готовностью мозга и тяжестью судорог 2—3 балла.

В 4-й серии опытов ежедневное введение цитиколина в течение 14 сут. и за час до титрования ПТЗ животным с тяжестью судорог 2—3 балла, так же как и во 2-й серии опытов, приводило к повышению на 16,83% порога клонической фазы судорог по сравнению с группой контроля и не оказывало влияния на тоническую фазу судорог (табл. 2).

Таблица 1

Влияние однократного введения цитиколина на пороги острой судорожной реакции у мышей С57В1/6 с повышенной в результате киндлинга судорожной активностью мозга ($M \pm m$)

Серия опытов	Группы и число (n) животных	Доза ПТЗ, вызывающая судороги			
		Клонические судороги		Тонические судороги	
		мг/кг	%	мг/кг	%
II; 14 сут. киндинга	1 — физ. раствор; n = 13	26,33 ± 0,88	100,00 ± 3,34	52,91 ± 1,19	100,00 ± 1,63
	2 — цитиколин 500 мг/кг; n = 12	31,41 ± 0,91*	119,29 ± 3,46	55,46 ± 1,32	104,82 ± 2,50
III; 24 сут. киндинга	1 — физ. раствор; n = 10	25,30 ± 0,83	100,00 ± 3,28	36,15 ± 0,75#	100,00 ± 1,72
	2 — цитиколин 500 мг/кг; n = 11	24,89 ± 1,17	98,38 ± 4,63	36,63 ± 1,52#	101,58 ± 4,22

Примечание. * — $p < 0,001$ — по сравнению с соответствующим контролем; # — $p < 0,001$ — по сравнению с контролем и опытом IV серии (14 сут. киндлинга)

Таблица 2

Влияние ежедневного введения цитиколина в течение 14 и 24 сут. на пороги острой судорожной реакции у мышей С57В1/6 с повышенной в результате киндлинга судорожной активностью мозга ($M \pm m$)

Серия опытов	Группы и число (n) животных	Доза ПТЗ, вызывающая судороги			
		Клонические судороги		Тонические судороги	
		мг/кг	%	мг/кг	%
IV; 14 сут. киндинга	1 — физ. раствор; n = 14	26,26 ± 0,59	100,00 ± 2,25	53,87 ± 1,25	100,00 ± 2,32
	2 — цитиколин 500 мг/кг; n = 15	30,68 ± 0,91***	116,83 ± 3,47	52,62 ± 0,77	97,68 ± 2,45
V; 24 сут. киндинга	1 — физ. раствор; n = 13	23,55 ± 0,64	100,00 ± 2,72	35,46 ± 1,84##	100,00 ± 5,19
	2 — цитиколин 500 мг/кг; n = 11	27,27 ± 1,45**	115,80 ± 6,16	44,09 ± 2,30*#	124,34 ± 6,49

Примечание. *** — $p < 0,001$; ** — $p < 0,02$; * — $p < 0,01$ — по сравнению с соответствующим контролем; ## — $p < 0,001$; # — $p < 0,01$ — по сравнению с контролем и опытом IV серии (14 сут. киндлинга)

В 5-й серии опытов ежедневное введение цитиколина в течение 24 сут. и за час до титрования ПТЗ животным с тяжестью судорог 3—5 баллов приводило к повышению судорожного порога, необходимого как для появления как клонических судорог, так и тонической фазы судорог с летальным исходом, на 15,80% и 24,34% соответственно. Таким образом, у животных с более длительной терапией цитиколином, противосудорожный эффект более выражен.

Следует отметить, что доза ПТЗ, необходимая для появления клонических и тонических судорог после 24 сут. киндлинга была меньше по сравнению с 14-ми сут. (табл. 1, 2). Данное обстоятельство связано с тем, что киндлинг — как процесс постепенно нарастающей судорожной активности мозга — имеет стадийность. Выделение стадий весьма условно. Вместе с тем, каждая стадия характеризуется своими присущими ей особенностями, являющимися результатом изменений, происшедших на предыдущей стадии. На ранней стадии киндлинга, до появления судорог, развитию эпилептогенеза предшествует усиление защитных саногенетических механизмов (активация антиэпилептогенных механизмов) и пока они эффективны — судороги не развиваются. На средней и заключительной стадии киндлинга, когда судороги возникли и их тяжесть нарастает, происходит ослабление анти- и усиление проэпилептогенных механизмов [8—10]. Поэтому на заключительной стадии киндлинга (24-е сут.) по сравнению со средней стадией (14-е сут.) и уменьшается доза ПТЗ, необходимая для появления судорог.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что цитиколин оказывает противосудорожное действие у животных с повышенной в результате киндлинга судорожной активностью мозга. У животных с более длительной терапией цитиколином, противосудорожный эффект более выражен. Противосудорожный эффект цитиколина связан с его нейропротективным и нейрорегенеративным действием [3, 4, 11]. Экзогенно введенный цитиколин активирует механизмы защиты от действия повреждающих факторов. Показано, что он восстанавливает поврежденные цитоплазматические и митохондриальные мембраны нейронов, предотвращая гибель клеток. Цитиколин снижает интенсивность выброса возбуждающего нейротрансмиттера глутамата и подавляет экспрессию проапоптотных белков, ингибирует механизмы апоптоза. Помимо этого он препятствует избыточному образованию свободных радикалов. [2, 3, 5, 12—14]. Эти свойства цитиколина способствуют улучшению функционирования таких мембранных структур, как ионные насосы и рецепторы, без регуляции которых невозможно нормальное проведение нервных импульсов.

Таким образом, экзогенно введенный цитиколин (длительное введение в течение 24 сут.) оказывает противосудорожный эффект на развитие острых генерализованных судорог у животных с повышенной в результате киндлинга судорожной активностью мозга.

Список литературы

1. Ветрилэ Л.А., Кузнецова Л.В., Клишина Н.Ю., Карпова М.Н. Аутоантитела к глутамату, ГАМК, серотонину и дофамину в динамике развития хронической эпилептизации мозга мышей C57Bl/6. *Патол. физиол. и эксперим. терапия.* 2010; 2: 11—4.
2. Зиньковский К.А. *Клинико-патохимические, иммунологические изменения и их терапевтическая коррекция у больных эпилепсией*: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. М., 2004. 22 с.
3. Карпова М.Н., Ветрилэ Л.А., Кузнецова Л.В., Клишина Н.Ю. Повышение порогов судорожной реакции после активной иммунизации конъюгатом глутамат-БСА мышей и при системном введении антител к глутамату. *Патогенез.* 2011; 1: 21—6.
4. Ребров И.Г., Карпова М.Н., Андреев А.А., Клишина Н.Ю., Калинина М.В., Кузина О.С., Кузнецова Л.В. СГ-проводимость ГАМК_A-рецепторного комплекса синаптических мембран коры головного мозга крыс на раннем этапе развития хронической эпилептизации мозга. *Бюл. эксперим. биол.* 2006; 142 (8): 139—41.
5. Ребров И.Г., Карпова М.Н., Андреев А.А., Клишина Н.Ю., Калинина М.В., Кузнецова Л.В. СГ-проводимость ГАМК_A-рецепторного комплекса синаптических мембран коры головного мозга крыс на средней стадии развития хронической эпилептизации мозга (фармакологического киндлинга). *Бюл. эксперим. биол.* 2007; 144 (11): 507—9.
6. Ребров И.Г., Карпова М.Н., Андреев А.А., Клишина Н.Ю., Калинина М.В., Кузнецова Л.В. СГ-проводимость ГАМК_A-рецепторного комплекса синаптических мембран коры головного мозга крыс после развития хронической эпилептизации мозга (фармакологического киндлинга). *Бюл. эксперим. биол.* 2008; 145 (3): 255—58.
7. Adibhatla R.M., Hatcher J.F. Citicoline decreases phospholipase A2 stimulation and hydroxyl radical generation in transient cerebral ischemia. *J. Neurosci. Res.* 2003; 73 (3): 308—15.
8. Alvarez-Sabin J., Roman G.C. The Role of Citicoline in Neuroprotection and Neurorepair in Ischemic Stroke. *Brain Sci.* 2013; 3(3): 1395—14.
9. Hurtado O., Cardenas A., Pradillo J.M., Morales, J.R., Ortego F., Sobrino T. et al. A chronic treatment with CDP-choline improves functional recovery and increases neuronal plasticity after experimental stroke. *Neurobiol. Dis.* 2007; 26 (1):105—11.
10. Hurtado O., Moro M.A., Cardenas A., Sanchez V., Fernandez-Tome P., Leza J.C. et al. Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport. *Neurobiol. Dis.* 2005; 18 (2): 336—45.
11. Krupinski J., Ferrer I., Barrachina M., Secades J.J., Mercadal J., Lozano R. et al. CDP-choline reduces pro-caspase and cleaved caspase-3 expression, nuclear DNA fragmentation, and specific PARP-cleaved products of caspase

activation following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neuropharmacology*. 2002; 42 (6): 846–54.

12. Mir C., Clotet J., Aledo R., Durany N., Argemi J., Lozano R. et al. CDP-choline prevents glutamate-mediated cell death in cerebellar granule neurons. *J. of Molecular Neuroscience*. 2003; 20: 53–9.

13. Saver J.L. Citicoline: update on a promising and widely available agent for neuroprotection and neurorepair. *Rev. Neurol. Dis.* 2008; 5 (4): 167–77.

14. Secades J.J. Probably role of citicoline instroke rehabilitation: review of literature. *Rev. Neurol.* 2012; 54 (3) 173–79.

References

1. Vetrile L.A., Kuznetsova L.V., Klishina N.Yu., Karpova M.N. Autoantibodies to glutamate, GABA, serotonin and dopamine in the dynamics of development of chronic brain epileptization C57BL/6 mice. *Patol. fiziol. i eksper. terapiya*. 2010; 2: 11–4. (in Russian)

2. Zin'kovskiy K.A. *Clinico-pathochemical, immunological changes and their therapeutic correction in patients with epilepsy*: Author. diss. for the degree of PhD Moscow; 2004. 22. (in Russian)

3. Karpova M.N., Vetrile L.A., Kuznetsova L.V., Klishina N.Yu. Raising the threshold of convulsive reactions after active immunization with conjugate glutamate-BSA and mice with systemic administration of antibodies to glutamate. *Patogenez*. 2011; 1: 21–6. (in Russian)

4. Rebrov I.G., Karpova M.N., Andreev A.A., Klishina N.Yu., Kalinina M.V., Kuzina O.S., Kuznetsova L.V. Cl⁻-conductance of the GABA_A receptor complex synaptic membranes of rat cerebral cortex at an early stage of chronic epileptization brain. *Byul. eksper. biol.* 2006; 142 (8): 139–41. (in Russian)

5. Rebrov I.G., Karpova M.N., Andreev A.A., Klishina N.Yu., Kalinina M.V., Kuznetsova L.V. Cl⁻-conductance of the GABA_A receptor complex synaptic membranes of rat cerebral cortex in the middle stages of chronic brain epileptization (pharmacological kindling). *Byul. Eksper. Biol.* 2007; 144 (11): 507–9. (in Russian)

6. Rebrov I.G., Karpova M.N., Andreev A.A., Klishina N.Yu., Kalinina M.V., Kuznetsova L.V. Cl⁻-conductance

of the GABA_A receptor complex synaptic membranes of rat cerebral cortex after the development of chronic brain epileptization (pharmacological kindling). *Byul. eksper. biol.* 2008; 145 (3): 255–58. (in Russian)

7. Adibhatla R.M., Hatcher J.F. Citicoline decreases phospholipase A2 stimulation and hydroxyl radical generation in transient cerebral ischemia. *J. Neurosci. Res.* 2003; 73 (3): 308–15.

8. Alvarez-Sabin J., Roman G.C. The Role of Citicoline in Neuroprotection and Neurorepair in Ischemic Stroke. *Brain Sci.* 2013; 3(3): 1395–414.

9. Hurtado O., Cardenas A., Pradillo J.M., Morales J.R., Ortego F., Sobrino T. et al. A chronic treatment with CDP-choline improves functional recovery and increases neuronal plasticity after experimental stroke. *Neurobiol. Dis.* 2007; 26 (1):105–11.

10. Hurtado O., Moro M.A., Cardenas A., Sanchez V., Fernandez-Tome P., Leza J.C. et al. Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport. *Neurobiol. Dis.* 2005; 18 (2): 336–45.

11. Krupinski J., Ferrer I., Barrachina M., Secades J.J., Mercadal J., Lozano R. et al. CDP-choline reduces pro-caspase and cleaved caspase-3 expression, nuclear DNA fragmentation, and specific PARP-cleaved products of caspase activation following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neuropharmacology*. 2002; 42 (6): 846–54.

12. Mir C., Clotet J., Aledo R., Durany N., Argemi J., Lozano R. et al. CDP-choline prevents glutamate-mediated cell death in cerebellar granule neurons. *J. of Molecular Neuroscience*. 2003; 20: 53–9.

13. Saver J.L. Citicoline: update on a promising and widely available agent for neuroprotection and neurorepair. *Rev. Neurol. Dis.* 2008; 5 (4): 167–77.

14. Secades J.J. Probably role of citicoline instroke rehabilitation: review of literature. *Rev. Neurol.* 2012; 54 (3) 173–79.

Поступила 27.06.14
Received 27.06.14

Сведения об авторах:

Кузнецова Лада Владимировна (Kuznetsova Lada Vladimirovna) — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы ФГБУ НИИОПП РАМН

Карпова Маргарита Николаевна (Karpova Margarita Nikolaevna) — д.б.н., гл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН, e-mail: karpovamn@gmail.com

Зиньковский Константин Александрович (Zin'kovskiy Konstantin Aleksandrovich) — к.м.н., доцент каф. психиатрии, наркологии и медицинской психологии ГБОУ ВПО «Тверской ГМА» Минздрава России

Клишина Наталья Юрьевна (Klishina Nataliya Yur'evna) — науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН

Кирова Ю.И.¹, Шакова Ф.М.¹, Германова Э.Л.¹, Пальцын А.А.¹,
Романова Г.А.¹, Рыбникова Е.А.², Лукьянова Л.Д.¹

Ранние изменения экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора-1 α (HIF-1 α) в неокортексе крыс с разной толерантностью к острой гипоксии, перенесших фокальный ишемический инсульт префронтальной коры

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, Москва, 125315, Балтийская ул., 8; тел./факс: 601-23-66, e-mail: niiopp@mail.ru

² — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии им. И.П. Павлова» Российской академии наук, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6; тел. (812) 3280701, факс: (812) 3280501, e-mail: <http://www.infran.ru/>

С помощью иммуногистохимического метода показано, что в нормоксических условиях нейроны коры головного мозга (КГМ) способны экспрессировать HIF-1 α , однако интенсивность этого процесса различается у животных с различной толерантностью к гипоксии: у неустойчивых (НУ) крыс этот процесс выражен сильнее, чем у высокоустойчивых (ВУ). Двусторонний фокальный ишемический инфаркт префронтальной коры головного мозга крыс полностью подавлял экспрессию HIF-1 α в нейронах зоны ишемии и лишь частично — в зоне пениумбры. При этом степень выраженности нарушений в нейронах коры НУ, была больше, нежели у ВУ крыс. Все это предполагает большую функциональную значимость системы HIF-1 α для нейронов КГМ НУ крыс сравнительно с ВУ.

Ключевые слова: префронтальная кора головного мозга крыс, фотоиндуцируемый тромбоз, экспрессия HIF-1 α , толерантность к гипоксии

Kirova Yu.I.¹, Shakova F.M.¹, Germanova E.L.¹, Paltsyn A.A.¹,
Romanova G.A.¹, Rybnikova Ye.A.², Lukyanova L.D.¹

Urgent changes in the expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) in the neocortex of rats with different tolerance to acute hypoxia underwent focal ischemic stroke prefrontal cortex

¹ — Institute of general pathology and pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

² — Pavlov Institute of physiology RAS, 6, Makarova str., St.Peterburg, 199034, Russia

Using immunohistochemical method, it was demonstrated that neurons of the cerebral cortex have the capacity to express hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) in normoxia. Intensity of this process is different for rats having unequal tolerance to hypoxia. Basal HIF-1 α expression in neurons of rats with low-resistance (LR) to hypoxia is higher compared to rats with high-resistance (HR). Bilateral photochemically induced focal ischemic insult in the rat prefrontal cortex completely suppressed HIF-1 α neuronal expression the in the ischemic zone and only partially — in the area of the penumbra. Neuronal injury was more pronounced in cortex of LR rats compared to HR rats. These findings suggest that functional significance of HIF-1 α is greater in neurons of the cerebral cortex of LR rats compared to HR rats.

Key words: rat brain prefrontal cortex, photothrombosis, HIF-1 α expression, tolerance to hypoxia

Согласно современным представлениям, ответ организма на гипоксические воздействия включает изменения генной экспрессии, которые происходят очень быстро. Они инициируются при гипоксии через индукцию транскрипционных факторов, регуляторные компоненты кото-

рых, по-видимому, универсальны. Считается, что наиболее значимым среди них является специфический гипоксический транскрипционный фактор (hypoxia inducible factor) — HIF, ключевой регулятор экспрессии более 100 генов, контролирующих срочные и долгосрочные компенсаторные ответы организма на гипоксию (вазомоторный контроль, ангиогенез, эритропоэз, клеточная пролиферация, энергетический метаболизм) [1].

Для корреспонденции: Кирова Юлия Игоревна, (Kirova Yuliya Igorevna), к.биол.н., вед. науч. сотр., лаб. биоэнергетики ФГБУ «НИИОПП» РАМН, e-mail: bioenerg@mail.ru

Методика

HIF является базисным helix-loop-helix PAS белком, состоящим из индуцируемой α -субъединицы (1- α , 2- α или 3- α) и конститутивной β -субъединицы. Наиболее функционально значимой α -субъединицей является HIF-1 α , экспрессия которой кислородзависима. При обычном содержании кислорода во вдыхаемом воздухе (21%) время жизни HIF-1 α составляет несколько минут и, благодаря постоянно протекающему в цитозоле процессу его протеасомной деградации, его содержание в ядерной фракции в нормоксических условиях сравнительно невелико. При гипоксии активность кислородзависимых пролилгидроксилазных реакций, контролирующей протеасомную деградацию белка, подавляется, внутриклеточное содержание HIF-1 α стабилизируется и резко увеличивается. При этом происходит его быстрая аккумуляция в ядре, где он димеризуется с HIF-1 β , образуя комплекс, который индуцирует экспрессию других различных сигнальных генов-мишеней, кодирующих белки, которые вовлекаются в адаптивные процессы и медируют защитные и регенерирующие ответы [2]. В связи с этим принято считать, что нейропротекторные эффекты гипоксического/ишемического preconditionирования мозга являются HIF-1-опосредованными. Показано, например, что нейрон-специфический нокаут гена HIF-1 α снижает выживаемость нейронов при окклюзии средней церебральной артерии [3]. Роль HIF-1 α в защите клеток и тканей от гипоксического/ишемического поражения настолько значительна, что позволяет рассматривать возрастное снижение активности HIF-1 α как один из ведущих патогенетических механизмов развития ишемических состояний [2].

Несмотря на огромное количество исследований, посвященных изучению роли HIF-1 α при гипоксии, данные о влиянии ишемии на его экспрессию в мозге ограничены и противоречивы. Так, Demougeot с соавторами на модели фототромботического кортикального инфаркта показали, что уровень HIF-1 α снижался градуально от центра ишемического поражения к более отдаленным регионам [4]. Однако Bergeron с соавторами, применив модель фокальной ишемии, наоборот, наблюдали экспрессию HIF-1 α в ишемическом мозге, главным образом, в зоне пенумбры, которая формируется вокруг зоны погибших нейронов [5].

Известно, что эволюционно сформировавшаяся различная устойчивость животных к гипоксии генетически детерминирована [6, 7]. Это делает исключительно важным изучение у них особенностей адаптации к гипоксии и роли в этом процессе фактора HIF. Однако в литературе такие данные отсутствуют.

Цель работы — исследование ранних изменений экспрессии HIF-1 α в префронтальном неокортексе при развитии фототромботического кортикального инфаркта у крыс с различной толерантностью к гипоксии.

Работа проведена на двух фенотипах животных: неустойчивых (НУ) и высокоустойчивых (ВУ) к острой гипоксии крыс-самцов, содержащихся в виварии в стандартных условиях. Устойчивость к гипоксии определяли в барокамере по продолжительности переживания животными условий критической «высоты» (11 тыс. м; 190 Torr; 5% O₂) до появления патологических типов дыхания [8].

При проведении работы соблюдались требования по использованию животных для экспериментальных исследований, утвержденные Этическим комитетом Российской Академии наук.

Использована модель избирательного очагового фотохимического ишемического повреждения префронтальной коры головного мозга, которая позволяет оценить когнитивный дефицит, определить морфометрически объем повреждения мозга, исследовать молекулярно-клеточные нейропротекторные механизмы [9—11].

Двусторонний фокальный ишемический инфаркт префронтальной коры головного мозга крыс — поля F_{r1} и F_{r2} [12] создавали методом фотохимически индуцируемого тромбоза [13].

Операцию проводили под общим наркозом, вызываемым внутрибрюшинным введением хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг. После введения фотосенсибилизирующего красителя бенгальского розового («Sigma», USA; 40 мг/кг, внутривенно) крысу фиксировали в стереотаксисе, делали продольный разрез кожи и удаляли надкостницу. Для облучения использовали специальную установку, состоящую из источника холодного света — галогеновой лампы мощностью 250 Вт и световода с диаметром внутреннего сечения 3 мм. Световод устанавливали на расстоянии 1 мм от поверхности черепа, на 2 мм роstralнее брегмы и на 2 мм латеральнее сагиттального шва и облучали через кости черепа каждое из полушарий мозга холодным светом длиной волны 560 нм в течение 15 мин. Ложнооперированных животных подвергали тем же процедурам, за исключением введения красителя бенгальского розового.

Экспериментальные животные были разделены на 4 группы:

- группа 1 — НУ ложнооперированные крысы (n = 6; контроль к группе 2);
- группа 2 — НУ крысы с фототромбозом (n = 6; через 2 ч после операции);
- группа 3 — ВУ ложнооперированные крысы (n = 6; контроль к группе 4);
- группа 4 — ВУ крысы с фототромбозом (n = 6; через 2 ч после операции).

Крыс декапитировали и извлекали головной мозг через 2 ч после индукции фототромбоза. Образцы

ткани мозга в течение 48 ч фиксировали в 4% параформальдегиде, приготовленном на 0,1М фосфатном буфере (рН 7,4), и подвергали гистологической обработке по стандартному протоколу. Далее изготавливали серии фронтальных парафиновых срезов мозга толщиной 6 мкм на уровне 4,70 мм от брегмы [12] и монтировали их на предметные стекла.

Для гистологической оценки степени поражения нейрональных клеток срезы депарафинизировали и окрашивали 0,5% крезил виолетом по методу Ниссля. В таких препаратах оценивали общий гистологический паттерн в области очага фокального инфаркта и пенумбры префронтальной коры головного мозга (КГМ) крыс.

Экспрессию белка HIF-1 α оценивали иммуногистохимическим методом [14]. Для этого срезы депарафинизировали, проводили демаскировку антигенных детерминант путем кипячения в 10 мМ цитратном буфере (рН 6,0) на водяной бане в течение 30 мин. Блокирование неспецифического связывания антител осуществляли инкубацией с PBS (phosphate buffered saline), содержащем 4% BSA (bovine serum albumin) и 0,05% тритон X-100 в течение 14 ч при 4°C. Инкубацию с первичными антителами (кроличьи анти-HIF-1 α антитела; 1:100; Santa Cruz Biotechnology; sc-10790) проводили в течение 20 ч при 4°C. Инкубацию со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой (козьи анти-кроличьи

IgG-HRP; 1:1000; Santa Cruz Biothecnology; sc-2030), проводили в течение 30 мин при 4°C. Пероксидазную активность выявляли реакцией с диаминобензидином.

В полученных препаратах определяли количество HIF-1 α -экспрессирующих (HIF-1 α -иммунореактивных) клеток неокортекса, а также, исходя из плотности мечения HIF-1 α -антителами, выделяли классы клеток с низкой, средней, высокой HIF-1 α -иммунореактивностью. Для обчета препаратов использовали программу ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы «Statistica 6.0». Нормальность распределения признака в выборке оценивали по W-критерию Шапиро—Уилка. Отличия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Проведенный сравнительный гистологический анализ контрольных срезов префронтальной коры головного мозга двух исследованных фенотипов крыс показал, что статистически значимые различия в количестве нейронов у них отсутствуют. Нейроны с признаками повреждения также не были выявлены (рис. 1 А,Г). При этом у НУ и ВУ интактных крыс в префронтальной коре были обнаружены

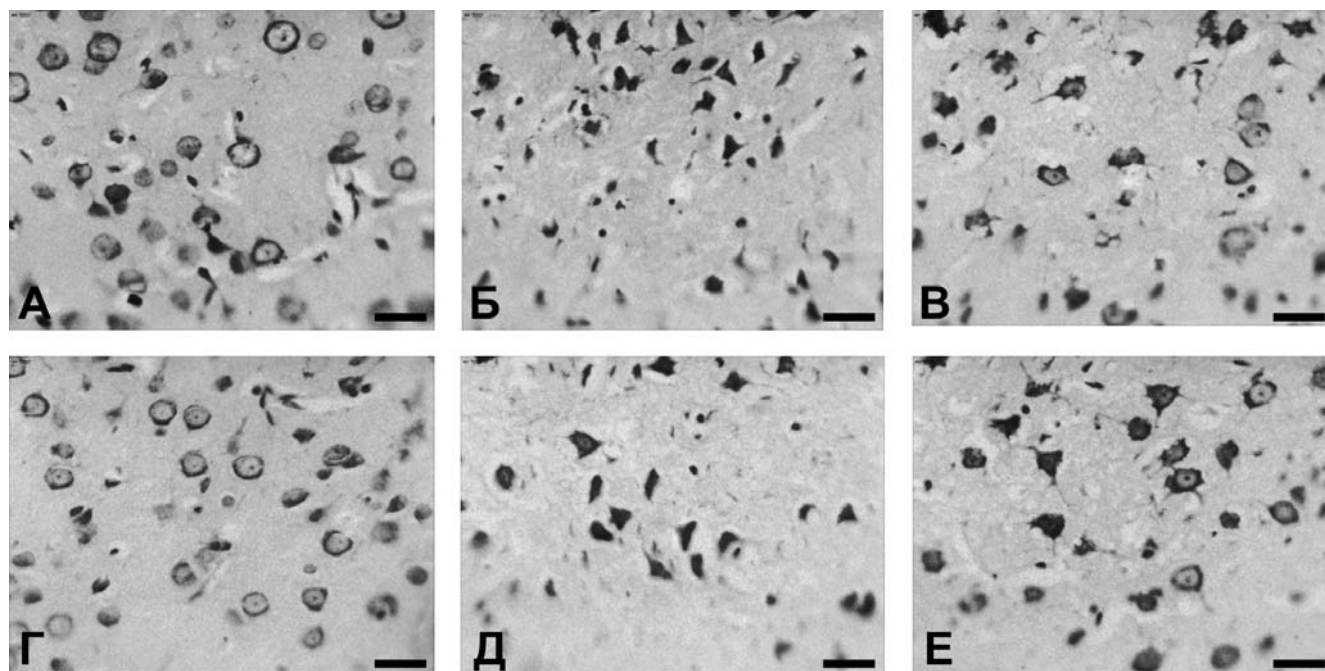


Рис. 1. Гистологические срезы префронтальной коры головного мозга крыс с низкой устойчивостью (А — контроль; Б — зона ишемии; В — пенумбра) и высокой устойчивостью к гипоксии (Г — контроль; Д — зона ишемии; Е — пенумбра). Окраска по методу Ниссля. Калибровочный маркер 20 мкм.

HIF-1 α -экспрессирующие нейроны (рис. 2 А,В). У НУ крыс количество таких нейронов было на 25% больше, чем у ВУ крыс (рис. 3,А). В общем массиве иммунопозитивных клеток у НУ крыс количество нейронов с высокой HIF-1 α -иммунореактивностью превышало количество интенсивно меченых клеток у ВУ крыс в 5 раз (рис. 3 Б).

Таким образом, в нормоксических условиях нейроны префронтальной коры как ВУ, так и НУ крыс, несмотря на условия, благоприятные для деградации

HIF-1 α , обладают способностью экспрессировать и накапливать этот белковый фактор. Однако у НУ крыс эта способность выражена в гораздо большей степени, нежели у ВУ.

Выявленные фенотипические различия в нейрональной экспрессии HIF-1 α могут быть связаны как с неодинаковой активностью реакции убиквитинации, ответственной за деградацию белка в этих условиях, так и с различной интенсивностью синтеза HIF-1 α . Они могут также свидетельствовать о существенно большей

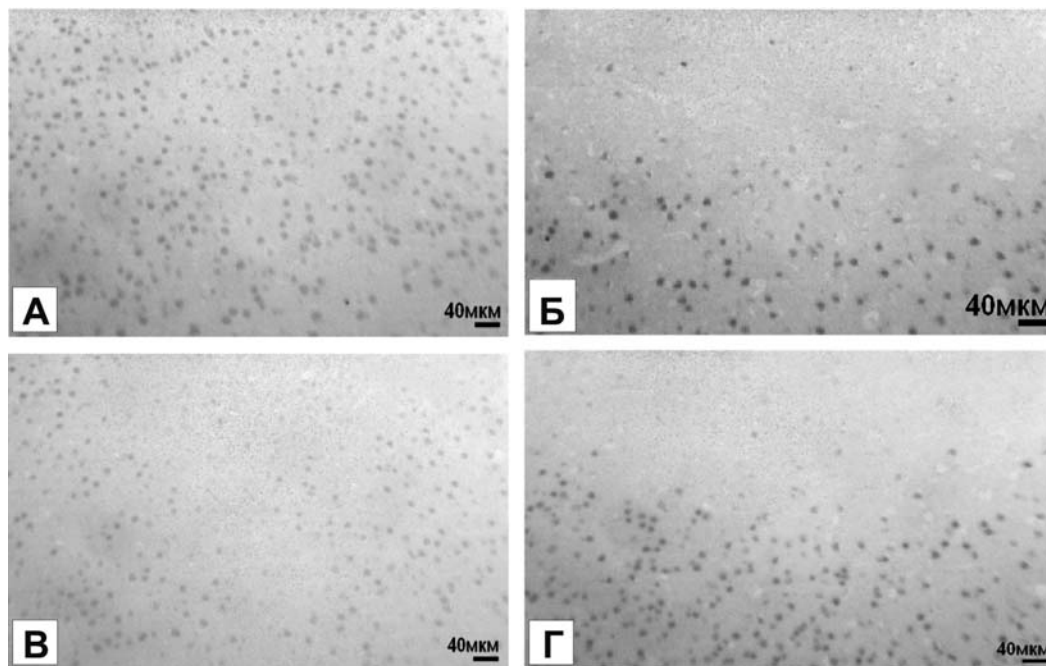


Рис. 2. Иммуногистохимическое определение HIF-1 α в препаратах префронтальной коры мозга крыс с низкой устойчивостью (А — контроль; Б — зона ишемии/пенумбра) и высокой устойчивостью к гипоксии (В — контроль; Г — зона ишемии/пенумбра).

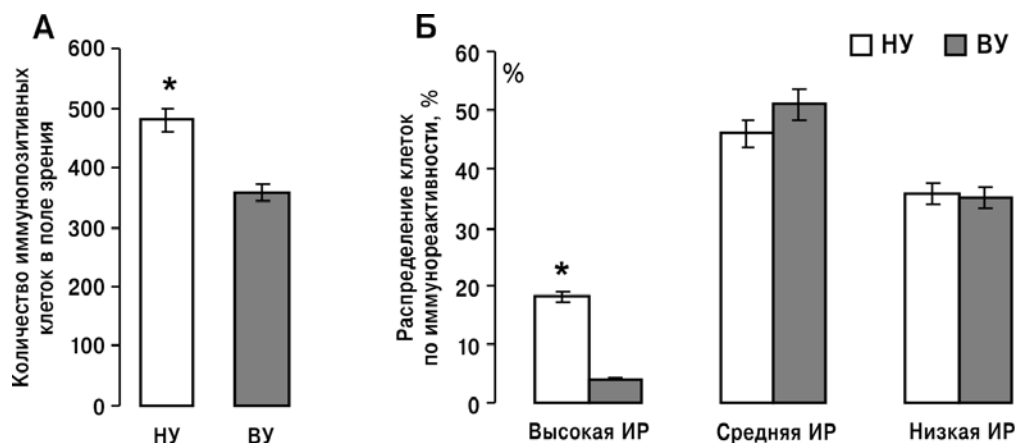


Рис. 3. Иммунореактивность к HIF-1 α в препаратах префронтальной коры мозга крыс с базовыми различиями в устойчивости к гипоксии (условия нормоксии):

А — абсолютное количество HIF-1 α -иммунопозитивных клеток в поле зрения (ПЗ); Б — распределение нейронов префронтальной коры по уровню HIF-1 α — иммунореактивности (ИР); * — значимые отличия ($p < 0,05$) между фенотипами низкоустойчивых (НУ) и высокоустойчивых (ВУ) к гипоксии крыс.

функциональной значимости системы HIF-1 α для нейронов КГМ НУ крыс сравнительно с ВУ.

Полученные результаты согласуются с данными литературы о сравнительно высоком базовом содержании HIF-1 α в коре нормоксического мозга [15], а также с результатами наших более ранних исследований. Нами было показано наличие обратной корреляции между базовым содержанием HIF-1 α в неокортексе и толерантностью животных к гипоксии: у НУ особей в нормоксических условиях уровень ядерного HIF-1 α КГМ был в 1,7 раза выше, чем у ВУ [16—18].

Через 2 ч после формирования тромба в зоне ишемии у НУ крыс выявлялись лишь необратимо поврежденные клетки, для которых были характерны деструктивные изменения ядер (пикноз, гиперхроматоз) (рис. 1 Б). У ВУ крыс в зоне ишемии среди необратимо поврежденных нейронов сохранялись единичные клетки с признаками сублетального повреждения (ядра уменьшены, контуры деформированы) (рис. 1 Д). При этом у обоих фенотипов животных в зоне ишемии практически отсутствовали нейроны, экспрессирующие HIF-1 α (рис. 2 Б,Г). Тем не менее, абсолютное содержание таких клеток у ВУ крыс было в 2 раза выше, чем у НУ животных (рис. 4 А).

Таким образом, в зоне острого ишемического повреждения происходило не только нарушение структуры нейронов, но и потеря ими способности к экспрессии HIF-1 α . Оба процесса были выражены в большей степени в КГМ НУ крыс.

В околоишемической зоне (пенумбре) у НУ и ВУ крыс выявлялись нейроны с признаками обратимого повреждения (гиперхромность, сморщивание тел нейронов, гомогенизация цитоплазмы, изменение конфигурации ядра) и нейроны с минимально измененной структурой. У НУ крыс количество поврежденных клеток было значительно больше, нежели у ВУ крыс (рис. 1 В,Е).

В отличие от зоны ишемии в пенумбре 60% нейронов КГМ НУ крыс сохраняли способность к экспрессии HIF-1 α по сравнению с контролем (рис. 2 Б, рис. 4 Б). При этом абсолютное количество клеток с высокой иммунореактивностью к HIF-1 α в этой зоне даже увеличилось (рис. 4 В). У ВУ крыс в зоне пенумбры наблюдалось не снижение, а статистически значимое увеличение количества HIF-1 α -экспрессирующих клеток сравнительно с контролем и увеличение количества нейронов со средним уровнем иммунореактивности (рис. 2 Г; рис. 4 Б,В). Направленность изменений исследуемых параметров в нейронах ВУ крыс может отражать активацию репаративных процессов.

Таким образом, и в этом случае наблюдались принципиальные отличия в ответной реакции нейронов

КГМ НУ и ВУ крыс на ишемию. Повреждающий структуру нейрона эффект ишемии в пенумбре был сильнее выражен в нейронах КГМ НУ животных и коррелировал с подавлением экспрессии HIF-1 α . Кроме того, в нейронах НУ крыс репаративные процессы начинали активироваться на фоне все еще выраженных нарушений экспрессии HIF-1 α .

Очевидно также, что по мере удаления от зоны ишемии (область пенумбры) степень выраженности нарушений экспрессии HIF-1 α в нейронах снижалась, что свидетельствует о зависимости этого процесса от дефицита кислорода в ткани.

Аналогичные данные были получены нами ранее при моделировании гипобарической гипоксии [16—19]. Нами было показано, что в неокортексе НУ крыс при гипоксических воздействиях слабой и умеренной силы наблюдается обратная зависимость между содержанием O₂ в среде и интенсивностью срочной экспрессии HIF-1 α . Однако при тяжелых формах гипоксии эта зависимость нарушается, и дальнейшее уменьшение уровня кислорода в среде

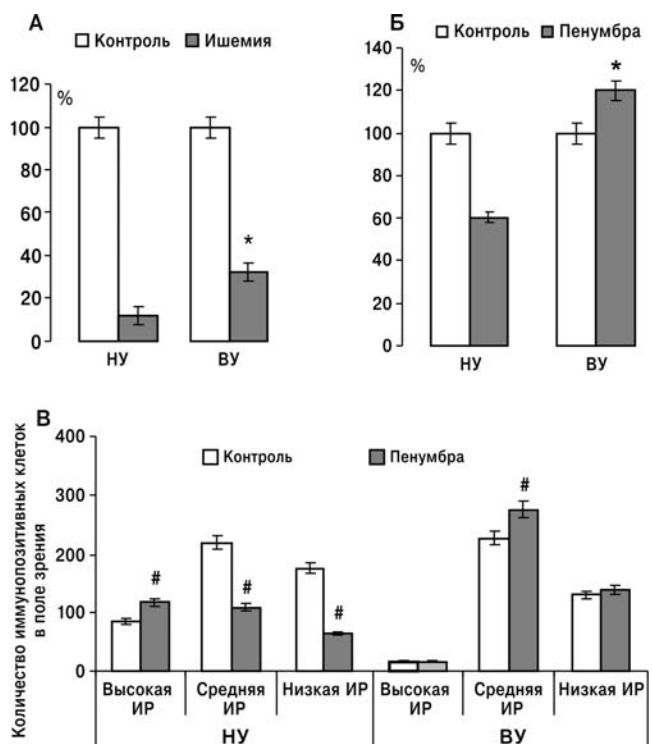


Рис. 4. Иммунореактивность к HIF-1 α в препаратах префронтальной коры мозга крыс с базовыми различиями в устойчивости к гипоксии через два часа после индукции фототромбоза:

А — содержание HIF-1 α -иммунопозитивных клеток в зоне ишемии; Б — содержание HIF-1 α -иммунопозитивных клеток в зоне пенумбры; В — распределение нейронов по уровню HIF-1 α — иммунореактивности (ИР); * — достоверные отличия ($p < 0,05$) между фенотипами низкоустойчивых (НУ) и высокоустойчивых (ВУ) к гипоксии крыс; # — достоверные отличия ($p < 0,05$) от контроля.

приводит к нарастающему снижению содержания HIF-1 α . В отличие от этого, в неокортексе ВУ крыс срочная фаза экспрессии HIF-1 α отсутствовала при любых гипоксических воздействиях.

Таким образом, полученные в работе результаты свидетельствуют о следующих принципиальных моментах:

а) нейроны КГМ способны экспрессировать HIF-1 α в нормоксических условиях, однако интенсивность этого процесса различается у двух фенотипов животных с различной толерантностью к гипоксии: у НУ крыс, резистентность которых к острой гипоксии была на порядок меньше, чем у ВУ животных, этот процесс выражен сильнее;

б) в условиях острого нарушения кровоснабжения, при развитии очаговой ишемии в области префронтальной коры, экспрессия HIF-1 α в нейронах данной зоны на ранней стадии процесса подавляется, а не индуцируется, как это наблюдается в условиях прекодиционирования;

в) степень повреждаемости системы HIF-1 при ответной реакции нейронов на острую локальную ишемию КГМ у НУ крыс выражена сильнее, чем у ВУ, т.е. зависит от исходной толерантности животных к гипоксии. Все это предполагает большую функциональную значимость системы HIF-1 α для нейронов КГМ НУ крыс сравнительно с ВУ.

Учитывая, однако, что ВУ животные лучше, чем НУ, переносят гипоксические/ишемические воздействия, можно предполагать, что формирование механизмов устойчивости к кислород-субстратному дефициту у них может контролироваться не только HIF-1, но и другими сигнальными системами. К аналогичным выводам мы пришли ранее при изучении сигнальных механизмов гипобарической и нормобарической гипоксии [16—21]. Существование альтернативных механизмов нейропротекции в постгипоксический период постулируется и в других работах [22].

В качестве одного из вероятных альтернативных претендентов на роль сигнальной молекулы при гипоксических/ишемических воздействиях может выступать универсальный фактор транскрипции — NF- κ B (nuclear factor κ B). Согласно современным представлениям, NF- κ B тесно взаимодействует с HIF-1 и выполняет роль внутриклеточного медиатора большого количества внешних воздействий, контролирует экспрессию генов иммунного ответа, клеточного цикла, факторов роста (сосудистого эндотелиального фактора роста, ангиопоэтина-1, фактора роста нервов), нейротрофического фактора мозга, аденозиновых рецепторов, рецепторов брадикинина, антиапоптотических белков [23—25].

Список сигнальных механизмов, участвующих в адаптации к гипоксии, постоянно расширяется. Для нервной системы, по-видимому, особое значение име-

ет глутаматергическая система, роль которой в этих процессах интенсивно исследуется в настоящее время. Несомненно, большое значение могут иметь аденозиновые и пуринергические рецепторы, о которых мы также пока знаем недостаточно. Принципиальным остается изучение взаимодействия этих рецепторов с симпато-адреналовой системой. Имеющиеся отрывочные сведения указывают на возможность таких взаимодействий. Таким образом, необходимо дальнейшее исследование взаимодействия всех этих сигнальных путей и установления их роли в формировании системной адаптации.

Список литературы

1. Semenza G.L. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology*. 2009; 24: 97—106.
2. Semenza G.L. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev*. 2000; 14: 1983—1991.
3. Baranova O., Miranda L.F., Pichiule P., Dragatsis I., Johnson R.S., Chavez J.C. Neuron-specific inactivation of the hypoxia inducible factor 1 α increases brain injury in a mouse model of transient focal cerebral ischemia. *J. Neurosci*. 2007; 23: 6320—6332.
4. Demougeot C., Van Hoecke M., Bertrand N., Prigent-Tessier A., Mossiat C., Beley A. et al. Cytoprotective efficacy and mechanisms of the liposoluble iron chelator 2,2'-dipyridyl in the rat photothrombotic ischemic stroke model. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2004; 3: 1080—7.
5. Bergeron M., Yu A.Y., Solway K.E., Semenza G.L., Sharp F.R. Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain. *Eur. J. Neurosci*. 1999; 12: 4159—70.
6. Лукьянова Л.Д. Функционально-метаболические особенности животных с различной индивидуальной резистентностью к гипоксии. В кн.: Лукьянова Л.Д., Ушаков И.Б., ред. *Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты*. Воронеж: Истоки; 2004: 156—170.
7. Лукьянова Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2011; 1: 3—19.
8. Лукьянова Л.Д., Германова Э.Л., Копаладзе Р.А. Закономерности формирования резистентности организма при разных режимах гипоксического прекодиционирования: роль гипоксического периода и реоксигенации. *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2009; 147 (4): 380—4.
9. Барсков И.В., Стельмашук Е.В., Романова Г.А., Хаспеков Л.Г. Морфологическое исследование нейропротекторных свойств дипептидного миметика фактора роста нервов (ГК-2h) при фокальном ишемическом повреждении префронтальной коры головного мозга крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2013; 4: 17—20.
10. Романова Г.А. Дизрегуляторные нарушения интегративной деятельности мозга при фокальной ишемии коры. В кн.: Крыжановский Г.Н., ред. *Дизрегуляторная патология*. М.: Медицина; 2002: 605—615.

References

11. Романова Г.А., Шакова Ф.М., Барсков И.В., Стельмашук Е.В., Соколов М.А. Функциональные и морфологические повреждения при фокальной ишемии префронтальной коры головного мозга крыс; коррекция с помощью нового оригинального препарата Целлекс. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2010; 110 (9): 52—6.
12. Paxinos G., Watson S. *Atlas of anatomy of rat brain*. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press; 1998.
13. Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R., Wachtel M.S., Ginsberg M.D. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann. Neurol.* 1985; 17: 497—504.
14. Wolf A., Agnihotri S., Micallef J., Mukherjee J., Sabha N., Cairns R. et al. Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme. *J. Exp. Med.* 2011; 208: 313—326.
15. Stroka D.M., Burkhardt T., Desbaillets I., Wenger R.H., Neil D.A., Bauer C. et al. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J.* 2001; 15: 2445—53.
16. Кирова Ю.И. Влияние гипоксии на динамику содержания HIF-1 α в КГМ и формирование адаптации у крыс с различной резистентностью к гипоксии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2012; 3: 51—55.
17. Кирова Ю.И., Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д. Фенотипические особенности динамики содержания HIF-1 α в неокортексе крыс при различных режимах гипоксии. *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2012; 154 (12): 681—6.
18. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И., Сукоян Г.В. Сигнальные механизмы адаптации к гипоксии и их роль в системной регуляции. *Биологические мембраны*. 2012; 29 (4): 238—52.
19. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И., Сукоян Г.В. Новое о сигнальных механизмах формирования срочной и долгосрочной адаптации к гипоксии. *Патогенез*. 2011; 3: 4—14.
20. Лукьянова Л.Д., Сукоян Г.В., Кирова Ю.И. О роли провоспалительных факторов, NO и некоторых показателей липидного обмена в формировании срочной адаптации к гипоксии и аккумуляции HIF-1 α . *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2012; 154 (11): 550—554.
21. Lukyanova L.D., Kirova Yu.I., Sukoyan G.V., Germanova E.L. Role of HIF-1 α in signaling mechanisms of urgent and long-term adaptation in different regimens of hypoxic training. In: Popescu L.M., Hargens A.R., Singal P.K., eds. *Adaptation Biology and Medicine*. New Delhi, India: Narosa Publishing House; 2014: 283—309.
22. Helton R., Cui J., Scheel J.R., Ellison J.A., Ames C., Gibson C. et al. Brain-specific knock-out of hypoxia-inducible factor-1 reduces rather than increases hypoxic-ischemic damage. *J. Neurosci.* 2005; 16: 4099—107.
23. Chilov D., Kukk E., Taira S., Jeltsch M., Kaukonen J. et al. Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C. *J. Biol. Chem.* 1997; 40: 25176—83.
24. Heese K., Inoue N., Sawada T. NF-kappaB regulates B-cell-derived nerve growth factor expression. *Cell. Mol. Immunol.* 2006; 1: 63—6.
25. Uden P., Kenneth N.S., Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 by NF-kB. *Biochem. J.* 2008; 412: 477—84.
1. Semenza G.L. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology*. 2009; 24: 97—106.
2. Semenza G.L. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes. Dev.* 2000; 14: 1983—91.
3. Baranova O., Miranda L.F., Pichiule P., Dragatsis I., Johnson R.S., Chavez J.C. Neuron-specific inactivation of the hypoxia inducible factor 1 α increases brain injury in a mouse model of transient focal cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 2007; 23: 6320—32.
4. Demougeot C., Van Hoecke M., Bertrand N., Prigent-Tessier A., Mossiat C., Beley A. et al. Cytoprotective efficacy and mechanisms of the liposoluble iron chelator 2,2'-dipyridyl in the rat photothrombotic ischemic stroke model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004; 3: 1080—7.
5. Bergeron M., Yu A.Y., Solway K.E., Semenza G.L., Sharp F.R. Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 1999; 12: 4159—70.
6. Lukyanova L.D. Functional-metabolic characteristics of animals with different individual resistance to hypoxia. In: Lukyanova L.D., Ushakov I.B., eds. *Problems of hypoxia: molecular, physiological and medical aspects*. Voronezh: Istoki; 2004: 156—170 (in Russian).
7. Lukyanova L.D. Modern problems of adaptation to hypoxia. Signaling mechanisms and their role in the systemic regulation. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2011; 1: 3—19 (in Russian).
8. Lukyanova L.D., Germanova E.L., Kopaladze R.A. Regularities of the development of resistance of the organism at different modes of hypoxic preconditioning: role of the hypoxic period and reoxygenation. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2009; 147 (4): 380—4 (in Russian).
9. Barskov I.V., Stel'mashuk E.V., Romanova G.A., Khaspekov L.G. Morphological examination of the neuroprotective effects of the dipeptide mimetic nerve growth factor (GC-2h) in focal ischemic damage to the prefrontal cortex of rats. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2013; 4: 17—20 (in Russian).
10. Romanova G.A. Disregulatory violations integrative activity of the brain cortex during focal ischemia. In: Kryzhanovskiy G.N., ed. *Disregulatory pathology*. Moscow: Meditsina; 2002: 605—15 (in Russian).
11. Romanova G.A., Shakova F.M., Barskov I.V., Stel'mashuk E.V., Sokolov M.A. Functional and morphological damage during focal ischemia prefrontal cortex of rats; correction with a new original drug Tselleks. *Zhurnal neurologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2010; 110 (9): 52—6. (in Russian)
12. Paxinos G., Watson S. *Atlas of anatomy of rat brain*. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press; 1998.
13. Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R., Wachtel M.S., Ginsberg M.D. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann. Neurol.* 1985; 17: 497—504.
14. Wolf A., Agnihotri S., Micallef J., Mukherjee J., Sabha N., Cairns R. et al. Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme. *J. Exp. Med.* 2011; 208: 313—26.
15. Stroka D.M., Burkhardt T., Desbaillets I., Wenger R.H., Neil D.A., Bauer C. et al. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J.* 2001; 15: 2445—53.

16. Kirova Yu.I. Effect of hypoxia on the dynamics of the content HIF-1 α in cerebral cortex and the formation of adaptation in rats with different resistance to hypoxia. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2012; 3: 51–5. (in Russian)
17. Kirova Yu.I., Germanova E.L., Lukyanova L.D. Phenotypic features of the dynamics of content HIF-1 α in the neocortex of rats at different modes of hypoxia. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2012; 154 (12): 681–86. (in Russian)
18. Lukyanova L.D., Kirova Yu.I., Sukoyan G.V. Signaling mechanisms of adaptation to hypoxia and their role in the system of regulation. *Biologicheskie membrany*. 2012; 29 (4): 238–52. (in Russian)
19. Lukyanova L.D., Kirova Yu.I., Sukoyan G.V. New about the signaling mechanisms of formation the urgent and long-term adaptation to hypoxia. *Patogenez*. 2011; 3: 4–14 (in Russian).
20. Lukyanova L.D., Sukoyan G.V., Kirova Yu.I. The role of pro-inflammatory factors, NO and some parameters of lipid metabolism in the formation of urgent adaptation to hypoxia and accumulation HIF-1 α . *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2012; 154 (11): 550–4 (in Russian).
21. Lukyanova L.D., Kirova Yu.I., Sukoyan G.V., Germanova E.L. Role of HIF-1 α in signaling mechanisms of urgent and long-term adaptation in different regimens of hypoxic training. In: Popescu L.M., Hargens A.R., Singal P.K., eds. *Adaptation Biology and Medicine*. New Delhi, India: Narosa Publishing House; 2014: 283–309.
22. Helton R., Cui J., Scheel J.R., Ellison J.A., Ames C., Gibson C. et al. Brain-specific knock-out of hypoxia-inducible factor-1 reduces rather than increases hypoxic-ischemic damage. *J. Neurosci*. 2005; 16: 4099–4107.
23. Chilov D., Kukk E., Taira S., Jeltsch M., Kaukonen J. et al. Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C. *J. Biol. Chem*. 1997; 40: 25176–83.
24. Heese K., Inoue N., Sawada T. NF-kappaB regulates B-cell-derived nerve growth factor expression. *Cell. Mol. Immunol*. 2006; 1: 63–6.
25. Uden P., Kenneth N.S., Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 by NF- κ B. *Biochem. J*. 2008; 412: 477–84.

Поступила 18.06.14
Received 18.06.14

Сведения об авторах:

Шакова Фатимат Мухамедовна (Shakova Fatimat Muhamedovna) — к.м.н., ст. науч. сотр., лаборатория общей патологии нервной системы ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Германова Элита Леонидовна (Germanova Elita Leonidovna) — к.биол.н., ст. науч. сотр., лаб. биоэнергетики ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Пальцын Александр Александрович (Paltsyn Alexander Alexandrovich) — д.биол.н., профессор, лауреат государственной премии СССР, зав. лабораторией, лаб. регуляции репаративных процессов ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Романова Галина Александровна (Romanova Galina Alexandrovna) — д.биол.н., профессор, гл. науч. сотр., лаб. общей патологии нервной системы ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Рыбникова Елена Александровна (Rybnikova Yelena Alexandrovna) — д.биол.н., гл. науч. сотр., лаб. нейроэндокринологии, ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН

Лукьянова Людмила Дмитриевна (Lukyanova Ludmila Dmitrievna) — член-корр. РАМН, д.биол.н., профессор, зав. лабораторией, лаб. биоэнергетики ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Алчинова И.Б., Архипова Е.Н., Медведева Ю.С., Ежова О.А., Черепов А.Б., Карганов М.Ю.

Сдвиги в субклеточном составе сыворотки при астме: моделирование на животных, клиника и мониторинговые исследования

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

В работе была воспроизведена модель бронхиальной астмы мышей, развитие и течение которой оценивали по метаболическим сдвигам в сыворотке крови мышей. Эти результаты сравнивали с данными метаболических сдвигов у пациентов с бронхиальной астмой. У подопытных мышей наблюдались патологические изменения в легких, были обнаружены значительный лимфоцитоз и уменьшение количества нейтрофилов. Метаболические сдвиги в сыворотке крови и моче изучали с помощью метода лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС). Метод ЛКС позволяет определить процентный вклад в светорассеяние частиц разного размера. Подобные модели распределения частиц в биологических жидкостях экспериментальных животных и пациентов показывают, что метод ЛКС может быть использован в качестве дополнительного метода для оценки тяжести заболевания и эффективности терапии.

Ключевые слова: бронхиальная астма, лазерная корреляционная спектроскопия, моделирование астмы, мониторинговые исследования

Alchinova I.B., Arkhipova E.N., Medvedeva Yu.S., Ezhova O.A., Cherepov A.B., Karganov M.Yu.

Shifts in subcellular content of blood serum and urine at asthma: animal model, clinic and monitoring data

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

We reproduced mouse model of bronchial asthma, evaluated metabolic shifts of serum homeostasis during disease development, and compared these results with the data on metabolic shifts in bronchial asthma patients. In experimental mice pronounced pathological changes in the lungs, considerable lymphocytosis and decrease in neutrophil count were detected. Metabolic shifts were studied using method of laser correlation spectroscopy (LCS) of blood serum and urine. Method of LCS allows determining the dispersion composition of the studied fluid by the relative contribution of particle components into light scattering. The relative content of particles of different size characterizes the direction of metabolic shifts in the organism. Similar patterns of particle distribution in biological fluids of experimental animals and patients suggest that LCS can be used as an additional method for evaluation of the severity of the disease and efficiency of therapy.

Key words: bronchial asthma, laser correlation spectroscopy, simulation of asthma, monitoring researches

В настоящее время аллергическая бронхиальная астма (БА) успешно моделируется у мышей, крыс, морских свинок, овец, кроликов, собак, кошек и приматов. У каждого из перечисленных млекопитающих удается воспроизводить специфический спектр признаков астмы. По причине высокой стоимости, продолжительности и сложности экспериментальных работ использование крупных млекопитающих является затруднительным. Поэтому в настоящее время наиболее сбалансированным и применяемым является моделирование БА на лабораторных мышах [1], имеющее ряд значительных

преимуществ. Уникальность «мышинной астмы» заключается в сочетании следующих факторов. Прежде всего, удастся обеспечить высокую степень соответствия ключевых гистологических, иммунных и функциональных признаков экспериментальной патологии и астмы человека. В настоящее время хорошо отработана технология получения чистых линий трансгенных и нокаутных мышей. Мыши являются удобным экспериментальным объектом по причине невысоких материальных и трудовых затрат на их содержание, питание, а также короткого репродуктивного цикла.

Известно, что выяснение влияния наследственности человека на патологические проявления, ассоциированные с БА, представляет значительные трудности, поскольку невозможно включить в исследование

Для корреспонденции: Алчинова Ирина Борисовна, к.б.н., ведущий науч. сотр. лаборатории полисистемных исследований ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН

генетически однородные группы испытуемых. По сути, чистые линии животных позволяют проводить эксперименты, оценивающие влияние только внешних факторов на едином «генетическом» фоне.

Недостаточность современных знаний о причинах развития астмы вынуждает воспроизводить отдельные признаки морфологических и функциональных изменений, характерных для данной патологии, а не для заболевания в целом.

Цель работы — оценка метаболических сдвигов сывороточного гомеостаза у мышей при моделировании у них бронхиальной астмы и сопоставление данных с метаболическими изменениями у пациентов с БА.

Методика

Моделирование бронхиальной астмы на мышах

Экспериментальная работа проводилась на мышах линии C57 BL (30 самцов, 21 самка), массой 18—20 г. В течение эксперимента животные содержались в стандартных условиях вивария.

Использовали краткосрочную безадьювантную модель IgE-зависимой бронхиальной астмы у лабораторных мышей с использованием аллергена пыльцы тимофеевки [2]. Животных опытной группы (самцы $n = 10$; самки $n = 9$) иммунизировали внутрибрюшинно (20 мкг/мышь) экстрактом пыльцы тимофеевки полевой («Микроген», Ставрополь) по схеме 7 раз через день. Через 3 недели после окончания интраперитонеальных инъекций проводили 8-кратное ежедневное интраназальное введение аллергена по 500 мкг/мышь. Контрольная группа была разделена на две подгруппы. Они получали ложную иммунизацию и провокацию: внутрибрюшинное и интраназальное введение физиологического раствора по схеме — в первой подгруппе (самцы $n = 10$; самки $n = 7$), и жидкости для разведения экстракта пыльцы тимофеевки — во второй (самцы $n = 10$; самки $n = 7$). В конце эксперимента (через 5 недель) все животные были подвергнуты эвтаназии путем декапитации.

Производили подсчет лейкоцитарной формулы. Сыворотку крови использовали для дальнейших исследований на лазерном корреляционном спектрофотометре [3]. Для патогистологического исследования у каждого животного брали легкие и фиксировали их в 10%-ном нейтральном формалине. Кусочки органов заливали в парафин и готовили гистосрезы толщиной 5—7 мкм на микротоме МНС-2 по общепринятым методикам с последующим их окрашиванием гематоксилином Майера и эозином. Дополнительно проводили окраску альциановым синим на выявление слизи, тучные клетки выявляли окраской толуидиновым синим, соединения железа (III) выявляли по Перлсу.

Лазерная корреляционная спектроскопия (ЛКС)

Метод ЛКС позволяет определять дисперсионный состав исследуемой жидкости по относительному вкладу частиц в светорассеяние. Представление распределения частиц после математической обработки в форме гистограмм дает возможность характеризовать их состав и классифицировать в соответствии с выделенными информативными зонами спектра. Относительное содержание частиц различного размера характеризует направление метаболических сдвигов в организме [3—6].

Анализ полученных показателей проводили с помощью пакета статистических программ «Statistica 6.0», используя стандартные методы вариационной статистики.

Все процедуры и эксперименты на животных проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Министерства здравоохранения РФ №267 от 19.06.2003 г.

Результаты и обсуждение

Морфологический анализ ткани легких у животных контрольной группы, получавших физиологический раствор, показал отсутствие патологических изменений. Альвеолярная стенка была хорошо развита, представлена среднего размера альвеолоцитами, полость альвеол равномерно округлая, не увеличена. Эпителий бронхов призматической формы с хорошо выраженной ворсинчатой каёмкой на апикальной части клеток. При окраске альциановым синим слизь обнаруживалась на поверхности слизистой оболочки бронхов лишь в виде тонкого слоя. Тучные клетки в единичном экземпляре встречались крайне редко.

У контрольной группы, получавшей жидкость для разведения аллергена, паренхима органа отличалась разнообразной картиной на разных участках среза. Форма и размер альвеол варьировал, большая часть из них сохраняла обычный план строения: альвеолярная стенка хорошо развита, представлена среднего размера альвеолоцитами, полость альвеол равномерно округлая, не увеличена. Отдельные группы альвеол, располагающиеся ближе к бронхам, отличались несколько утолщённой стенкой за счёт слабого отёка межальвеолярных перегородок. На периферийных участках гистологического среза лёгких отмечались небольшого размера маргинальные ателектазы, участки расширенных альвеол с истончением стенок и разрушением межальвеолярных перегородок. В срезах были представлены крупного, среднего и мелкого размера бронхи без признаков склероза стенок. Эпителий крупных бронхов относительно невысокой призматической формы с хорошо выраженной ворсинчатой каёмкой на апикальной части клеток. В отдельных мелкого и среднего размера бронхах наблюдается умеренно выраженная десквамация эпителия. При окраске срезов альциановым синим, на поверхности слизистой оболочки та-

ких бронхов можно обнаружить небольшое количество слизи. При окраске срезов толуидиновым синим в строме выявляются единичные тучные клетки, располагающиеся преимущественно в перибронхиальной соединительной ткани среднего и мелкого размера бронхов. Слизистые пробки не встречались.

В тканях легких мышей опытной группы были обнаружены выраженные патологические изменения. Слизистая оболочка крупных бронхов была утолщенной, имела складки. Наблюдали высокий, вытянутой пальцевидной формы эпителий бронхов. Апикальная часть реснитчатых эпителиоцитов была в состоянии деструкции, часто отпадала в просвет бронха, ворсинчатая каёмка на апикальной части клеток была выражена плохо. Поверхность слизистой оболочки бронха обнаружили покрытой обильным количеством зернистой белковой массы, которая давала положительную реакцию при окраске на слизь альциановым синим (рис. 1). В эпителиальном слое слизистой оболочки встречались многочисленные бокаловидные клетки. Базальная мембрана эпителия бронхов была утолщена. Вокруг бронхов встречалась умеренно выраженная лейкоцитарная инфильтрация. При окраске гистологических срезов толуидиновым синим в очагах перибронхиальной лейкоцитарной инфильтрации выявлялись многочисленные лаброциты (тучные клетки).

В мелких бронхах был менее выражен спазм и деструкция эпителия слизистой оболочки, однако из-за небольшого диаметра бронхов обильное слизееобразование и десквамация эпителия привела к закупорке их просвета (слизистая пробка) (рис. 2). Однако такая картина наблюдается нечасто.

Мыши относятся к организмам с лимфоцитарным профилем крови (так же как крысы, кролики, человек). Проведенный нами анализ относительного лейкоцитарного состава крови показал значимый лимфоцитоз в опытной группе и снижение числа нейтрофилов до нижней границы нормы (рис. 3).

Значимого изменения процента эозинофилов в мазках крови нами отмечено не было. Авторы этой модели также не наблюдали увеличения процента эозинофилов в крови [2]. Известно, что одни линии предрасположены к гиперпродукции IgE, другие — к развитию воспалительных изменений, а у третьих более выражены фиброзные процессы в легких. Кроме определения маркеров патологии, необходимо учитывать комплексные функциональные изменения организма животных.

Изменения в клеточном составе крови и тканях приводят к изменениям в составе сыворотки крови. Метод ЛКС позволяет оценить вклад в светорассеяние частиц различного гидродинамического радиуса для биологических жидкостей, в том числе для сыворотки крови и мочи. При сравнении ЛК-гистограмм сыворотки крови мышей в опыте наблюдается значимое снижение вклада

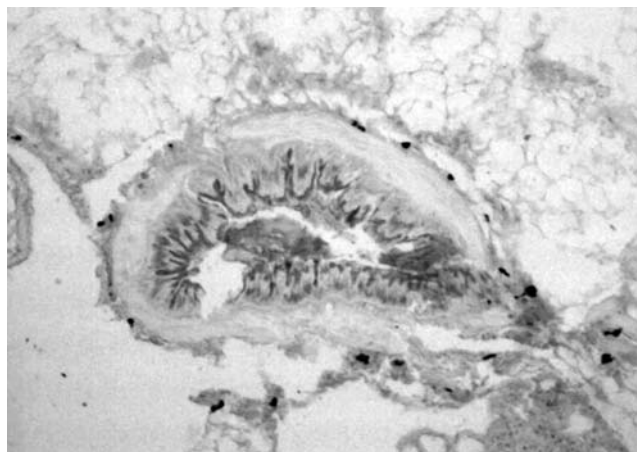


Рис. 1. Окраска слизи в бронхе мыши альциановым синим (опытная группа — иммунизированная пылью тимфеетки). Интенсивно синим цветом окрашена слизь, в центре бронха видна слизистая пробка. Увеличение 10 x 10.

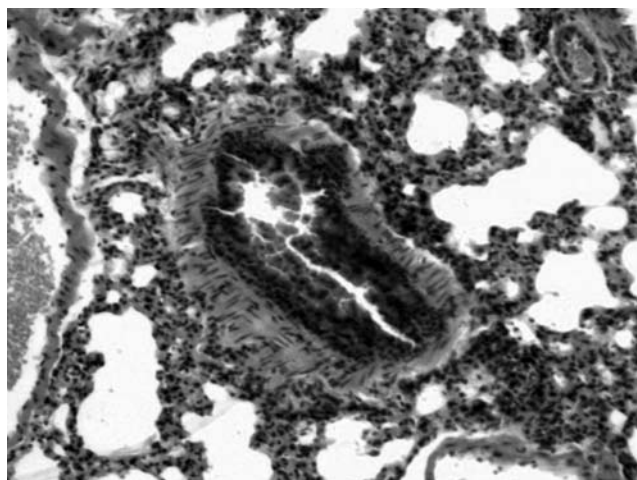


Рис. 2. Структура бронха мыши (опытная группа — иммунизированная пылью тимфеетки). В центре бронха скопление зернистой массы (тёмно-красный цвет) — слизистая пробка. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 10 x 10.

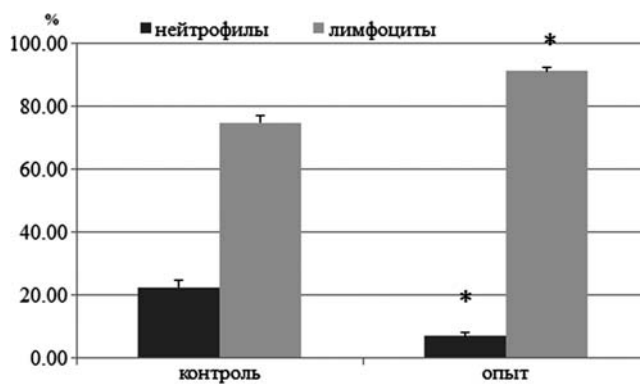


Рис. 3. Процент нейтрофилов и лимфоцитов у контрольных и опытных мышей с моделью БА. * — $p < 0,05$, критерий Манна–Уитни

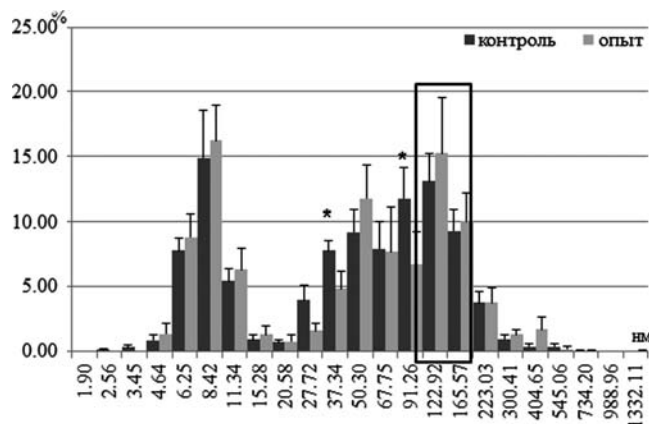


Рис. 4. ЛКС-гистограмма сыворотки крови мышей при моделировании БА. По оси абсцисс — размер частиц (нм); по оси ординат — процентный вклад в светорассеяние.



Рис. 5. Частота встречаемости различных метаболических сдвигов у мышей при моделировании БА, %.

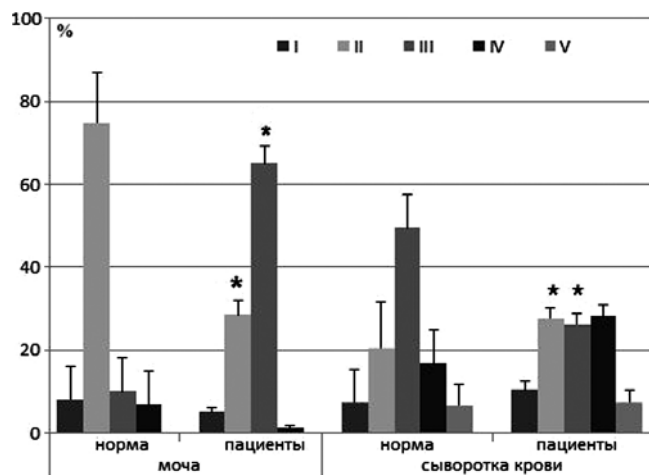


Рис. 6. Усредненные гистограммы ЛК-спектров мочи и сыворотки крови здоровых людей и пациентов с аллергическими заболеваниями бронхолегочной системы. По оси абсцисс — гидродинамические радиусы частиц в информативных зонах (нм): для мочи — I — менее 75 нм; II — 76—220 нм; III — 221—1500 нм; IV — более 1500 нм и сыворотки крови — I — 0—10 нм; II — 11—30 нм; III — 31—70 нм; IV — 71—150 нм; V — 150 и выше соответственно. По оси ординат — вклад частиц в светорассеяние (%). * — $p < 0,05$, критерий Манна–Уитни.

в светорассеяние частиц в точках 37 и 91 нм и тенденция к увеличению вклада частиц размером 122—165 нм по сравнению с контрольной группой (рис. 4).

У мышей опытной группы при моделировании БА отмечается большое количество смешанных сдвигов, которые характеризуются значительным вкладом в светорассеяние частиц малого размера (менее 10 нм) и крупных частиц (71—150 нм) (рис. 5).

Увеличение вклада частиц зоны 71—150 нм характерно для аллергических процессов, в то время как увеличение зоны <10 нм является следствием возрастания в сыворотке белков (альфа-1, альфа-2, бета-глобулинов), является показателем острых воспалений.

Так как исследованиям биологических жидкостей людей было отведено достаточно много экспериментов с использованием метода ЛКС, то шкалу абсцисс со временем и с накоплением данных стали делить на более крупные интервалы, так называемые информативные зоны частиц. По оси абсцисс стали откладывать гидродинамические радиусы частиц в информативных зонах (нм): для сыворотки крови — I — 0—10 нм; II — 11—30 нм; III — 31—70 нм; IV — 71—150 нм; V — 150 и выше соответственно, для мочи — I — менее 75 нм; II — 76—220 нм; III — 221—1500 нм; IV — более 1500 нм. По оси ординат — также вклад частиц в светорассеяние в процентах.

На основании данных, полученных при исследовании здоровых людей (без верифицированного диагноза), были построены усредненные гистограммы распределения светорассеивающих частиц по размерам для крови и мочи — так называемые нормальные спектры (рис. 6). Анализ аналогичных гистограмм пациентов с аллергической бронхиальной астмой показал, что в образцах мочи больных преобладают, по сравнению с «нормальными» спектрами, крупные частицы размером 221—1500 (III зона). Такое изменение спектральных показателей, согласно семиотическому классификатору, определяется как «аллергоподобные сдвиги» [5]. Основная идея семиотического классификатора заключается в том, что формирование патологического следа в организме человека зависит не только от природы заболевания, но и от взаимодействия между саэнтогенетическими системами организма. В ЛК-спектрах сыворотки крови увеличивается вклад в светорассеяние частиц малого размера, что свидетельствует об усилении процессов дегградации молекул, характерных для состояний, сопровождающихся интоксикацией организма («интоксикационноподобные сдвиги»).

Чтобы выяснить, какой вклад в метаболический гомеостаз вносят сопутствующие бронхиальной астме заболевания, провели ЛК-исследование образцов мочи и сыворотки крови пациентов, у которых была выявлена только БА, и пациентов с сопутствующим круглогодичным аллергическим ринитом (КАР). Не выявив достоверно значимых различий в распределении светорассеивающих час-

тиц (рис. 7), объединили эти две группы в одну и работали далее с одной большой когортой пациентов с БА.

Всех пациентов разделили на три подгруппы.

Первую подгруппу составили пациенты, которые вне зависимости от степени тяжести проявлений аллергосиндрома быстро отвечали на базовую терапию и при минимальном объеме детоксикационных и иммунологических мероприятий достигали медикаментозной ремиссии. Пациенты этой группы достигали самых лучших результатов в снижении дозировок базовых препаратов.

Во второй подгруппе при наличии яркой клинической картины лабораторные показатели отмечали кажущееся благополучие. Дальнейшее клиническое наблюдение за этой подгруппой пациентов позволило сделать вывод о том, что, по-видимому, имел место компенса-

торный срыв детоксикационной функции мочевыделительной системы (при нормальном клиническом анализе мочи). Эта подгруппа является переходной. Вероятно, при дальнейшем нарастании эндотоксикоза, пациенты переходят в 3-ю подгруппу. Требовался несколько больший объем детоксикационных мероприятий и иммунологического сопровождения для достижения ремиссии. Пациенты чаще при снижении дозировок базовых препаратов дестабилизировались и возвращались к более высоким дозам.

Третья подгруппа — на этой стадии эндотоксикоза происходит снижение общей активности комплемента, как проявление компенсаторного срыва уже в системе иммунитета. Пациенты при максимальном иммунологическом сопровождении базовой противовоспалительной

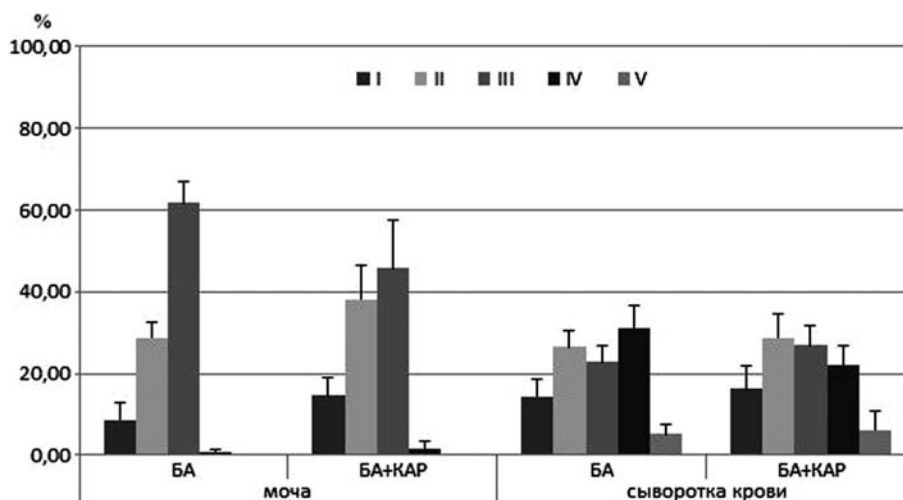


Рис. 7. Усредненные гистограммы ЛК-спектров мочи и сыворотки крови пациентов с БА и с БА с сопутствующим круглогодичным аллергическим ринитом (КАР). Обозначения осей как на рис. 6.

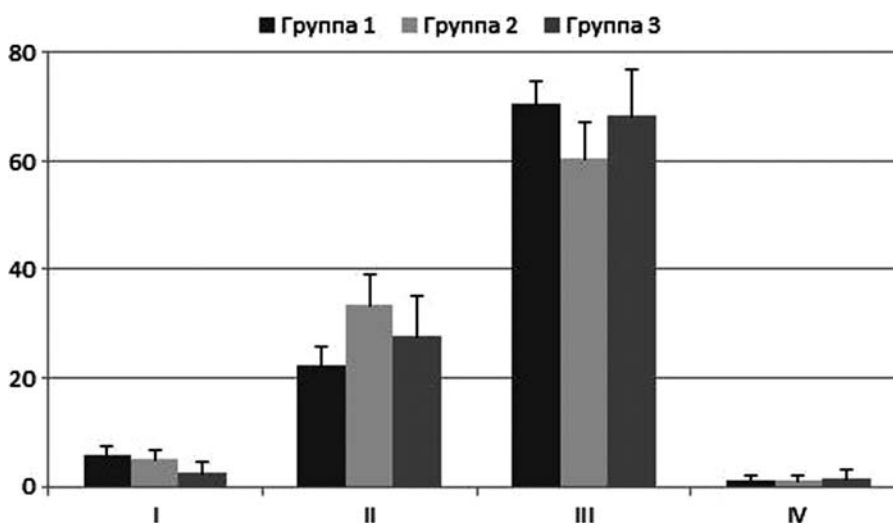


Рис. 8. Распределение светорассеивающих частиц в образцах мочи пациентов с различной степенью нарушений в состоянии защитных систем организма. По оси абсцисс — гидродинамические радиусы частиц в информативных зонах (нм): I — менее 75 нм; II — 76–220 нм; III — 221–1500 нм; IV — более 1500 нм. По оси ординат — вклад частиц в светорассеяние (%).

терапии дольше всего стабилизировались. Снижение доз базовых препаратов в этой группе шло медленнее всего.

Для ЛК-спектров мочи характерно сходное распределение частиц по размерам во всех обследованных подгруппах: максимальный вклад в светорассеяние вносят частицы размером 220—1500 нм (рис. 8). Появление в спектрах крупных частиц может указывать на развитие процессов алергизации в организме.

Анализ ЛК-спектров сыворотки крови выявил значимые отличия в распределении светорассеивающих частиц в трех обследованных подгруппах (рис. 9). В Гр.1 максимальный вклад в светорассеяние вносят частицы IV зоны (71—100 нм). В Гр.2 и Гр.3 доля частиц IV зоны снижена, а II зоны (11—30 нм) увеличена по сравнению с Гр.1 ($p < 0,05$; критерий Манна—Уитни). По характеру распределения светорассеивающих частиц можно предположить, что в Гр.1 преобладают «анаболические сдвиги» сывороточного гомеостаза. Как известно, при аллергических нарушениях происходит активация Th2-клеток и повышена продукция цитокинов: ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13 [8, 9]. ИЛ-5 способствует созреванию эозинофилов и их активации. ИЛ-4/ИЛ-13 индуцируют В-клетки к синтезу IgE [10]. Следовательно, с иммунологических позиций аллергический процесс на начальных этапах заболевания сопровождается появлением в крови крупных молекулярных комплексов.

Пациенты с «катаболическим» типом сдвигов составляют в Гр.1 20%, в Гр.2 — 50%, в Гр.3 — 62% (рис. 10). Таким образом, доля больных с эндогенной интоксикацией значимо выше в Гр.2 и Гр.3 по сравнению с Гр.1 ($p < 0,05$; двусторонний критерий Фишера).

Эмпирические выводы, сделанные на основе клинических наблюдений, объясняющие распределение пациентов по трем группам нашли подтверждение при ЛКС тех же сред. Преобладание интоксикационноподобных сдвигов в ЛК-спектрах сыворотки пациентов 2-й и 3-й подгруппы позволило сделать вывод о наличии смешанного характера воспалительного процесса у этих пациентов. Таким образом, в этих группах речь идет уже не только об аллергическом воспалении: при компенсаторном срыве мочевыделительной, а затем и иммунной систем присоединяется инфекционное воспаление.

Моделирование БА на мышцах с гистологическим подтверждением развившейся патологии позволило определить тип основных метаболических процессов происходящих в сыворотке крови и показало сходство ЛК-гистограмм у иммунизированных мышей и людей с БА. При моделировании БА на мышцах наблюдали отчетливую тенденцию к увеличению вклада в светорассеяние частиц сыворотки крови в диапазоне 122—165 нм. При обследовании пациентов с разными уровнями тяжести этого заболевания нарастал сходный диапазон частиц 71—150 нм (рис. 6) за счет сильного уменьшения вклада в светорассеяние частиц 30—70 нм. При этом максимально этот диапазон был увеличен в первой подгруппе пациентов (рис. 9, зона IV), которые находились на ранней стадии развития заболевания (вне зависимости от тяжести проявлений).

При моделировании того или иного заболевания следует учитывать стадию развития болезни. В данном случае удалось воспроизвести 1-ю стадию заболевания. Сходство между паттернами распределения частиц биологических жидкостей у модельных животных и пациентов позволяет использовать ЛКС как дополнительный метод для оценки тяжести заболевания и эффективности терапии.

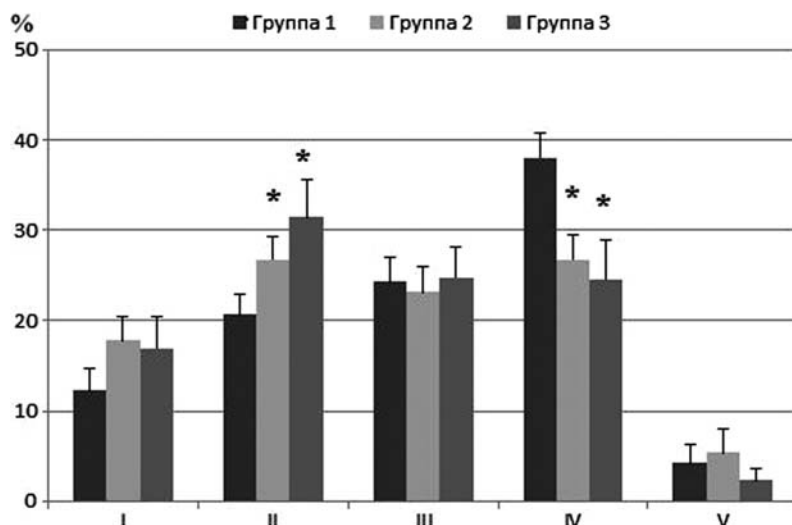


Рис. 9. Распределение светорассеивающих частиц в образцах сыворотки крови пациентов с различной степенью нарушений в состоянии защитных систем организма (пояснения в тексте). По оси абсцисс — гидродинамические радиусы частиц в информативных зонах (нм): I — 0—10 нм; II — 11—30 нм; III — 31—70 нм; IV — 71—150 нм; V — 150 и выше соответственно. По оси ординат — вклад частиц в светорассеяние (%). * — $p < 0,05$ (критерий Манна—Уитни) — отличия от Гр. 1.

Для создания адекватных подходов к массовым скрининговым исследованиям требуется некоторая модификация использованных методов. Знания, накопленные в многолетних токсико-эпидемиологических исследованиях, позволяют лишь определить достаточно обширный круг тех факторов внешней среды, которые потенциально опасны для жизнедеятельности.

В наших исследованиях по прямому тестированию метаболических сдвигов с помощью ЛКС биологических жидкостей 130 работников судоремонтного предприятия на Крайнем Севере мы получили возможность более аргументированно обсудить данную проблему.

По степени контакта с источниками потенциальной опасности (физическими, химическими) обследуемая популяция была разбита на 3 группы:

1) (минимальный контакт) — кладовщики, гардеробщики, уборщики и ИТР (24 чел.);

2) (обеспечение работ в цехе) — крановщики, маляры, электрики, стропальщики, слесари-ремонтники и слесари судопоезда (53 чел.);

3) (непосредственный контакт) — сварщики, газорезчики, судокорпусники, судовые слесари-монтажники и гуммировщики (53 чел.).

Из рис. 11 видно, что у большинства обследованных были выявлены аллергоподобные изменения метаболизма при исследовании мочи. Возможно, химические вещества, выделяющиеся в воздух в ходе ремонта и утилизации, в равной степени воздействуют на представителей всех трех групп, и этим обусловлено одинаковое представительство у них аллергоподобных сдвигов. Работники третьей группы находятся в непосредственном контакте с веществами, которые могут вызывать подобные эффекты (резиновая обшивка, провода, пластик и пр.). Невыполнение требований по применению средств индивидуальной защиты может приводить к попаданию воздушных взвесей внутрь организма, накоплению их и, соответственно, к повышенной частоте встречаемости аллергоподобных сдвигов в экскреторной системе.

В ходе массового обследования работников потенциально опасного производства с помощью ЛКС-анализа сыворотки крови и мочи, а также стандартного для медицинских работников определения количества эозинофилов в крови, была выделена группа риска по развитию аллергических заболеваний (5 женщин и 8 мужчин). В неё вошли люди с умеренной и выраженной степенью аллергоподобных и смешанных с аллергоподобными сдвигов.

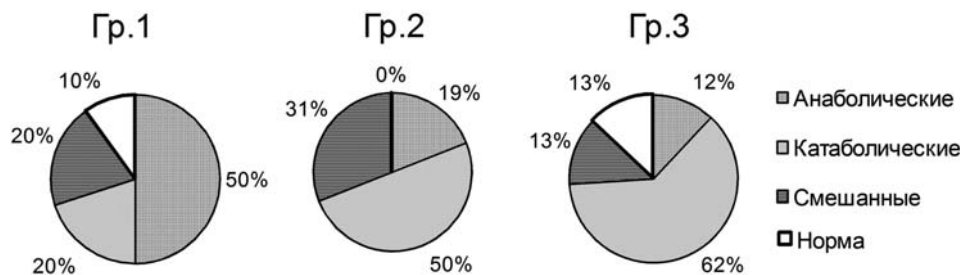


Рис. 10. Частота встречаемости различных типов ЛК-спектров в группах пациентов с различной степенью нарушений в состоянии защитных систем организма. Пояснения в тексте.

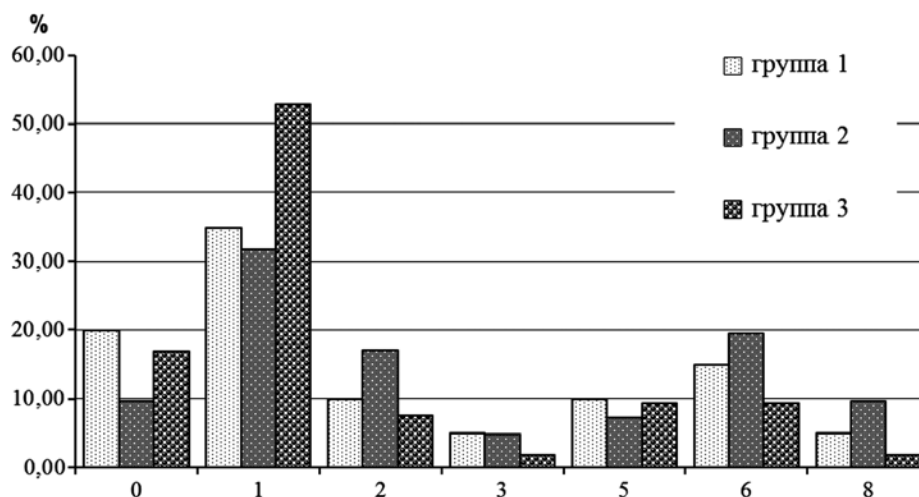


Рис. 11. Частота встречаемости преобладающих направлений метаболических сдвигов в экскреторной системе по результатам ЛКС мочи рабочих различных профессиональных групп. По оси абсцисс — направление сдвига (0 — нормологический; 1 — аллергоподобный; 2 — интоксикационноподобный; 3 — катаболический; 4 — аутоиммунноподобный; 5 — дистрофически-подобный; 6 — аллерго-интоксикационно-подобный; 8 — аллерго-дистрофически-подобный); по оси ординат — доля обследованных с данным направлением метаболического сдвига, %.

Результаты обследования лиц из группы риска по развитию аллергических заболеваний

№	Пол	Возраст	ЛКС сыв.	ЛКС моча	ЖЕЛ, л	Тиффно	Эозинофилы, %
1	М	50	1,3	1,3	3,6	0,47	5
2	Ж	56	6,2	1,3	1,2	0,56	0
3	М	26	6,2	3,3	3,8	0,56	7
4	М	41	8,2	2,3	5,6	0,69	0
5	М	21	1,3	6,3	5,9	0,71	0
6	М	41	6,2	1,3	4,7	0,8	3
7	Ж	45	8,2	6,3	2,6	0,82	2
8	М	34	6,2	3,3	4,3	0,83	3
9	М	23	1,3	1,3	5,3	0,88	0
10	М	35	1,3	1,3	4,2	0,9	4
11	Ж	60	6,2	6,3	2,5	0,9	6
12	Ж	35	6,2	2,3	2,6	0,94	2
13	Ж	40	1,3	6,3	2,3	0,98	2

При исследовании различных профессиональных групп с риском химических, радиационных и нерадиационных контактов было установлено, что формирование групп риска по чувствительности к изучаемым факторам осуществляется на основе того, в какой степени к первично регистрируемым сдвигам в плазменном гомеостазе подстраиваются основные физиологические регуляторные системы: сердечно-сосудистая, дыхательная, нервно-мышечная [11—13]. Поскольку в данном случае задачей является выделение группы риска по развитию заболевания бронхолегочной системы, последующее функциональное тестирование было проведено на программно-аппаратном комплексе «Спироартериокардиограф» [14, 15]. Оно показало снижение жизненной емкости легких у 5 чел. Также отмечено снижение индекса Тиффно у 4 чел. — этот показатель более важен при оценке развития аллергических бронхолегочных заболеваний (в таблице выделены рамкой). При этом у двух человек со сниженным индексом Тиффно наблюдали увеличение процента эозинофилов в крови.

Эозинофилия отмечается при аллергических заболеваниях, например, при бронхиальной астме (особенно в начале приступов и в промежутках между ними), сенной лихорадке, крапивнице, сывороточной болезни. Поэтому эозинофилия может быть использована для дифференцирования бронхиальной астмы от сердечной астмы, а также от бронхитов с приступами удушья, напоминающих бронхиальную астму.

Заключение

На основании изложенного, алгоритм определения тех или иных хронических радиационных, химических и комбинированных рисков должен содержать следующие этапы:

1. На основе устанавливаемых сдвигов в системе регуляции обмена веществ и гуморального иммунитета (ЛКС

биологических жидкостей) формируются референтные группы по дифференциально значимым сдвигам.

2. В соответствующих референтных группах выявляются варианты, которые связаны с функциональным перенапряжением в основных физиологических системах.

3. На основе системного анализа наиболее напряженных состояний основных физиологических систем в каждой из выделенных референтных групп формируются группы риска по соответствующим патологиям.

Список литературы

1. Крючков Н.А., Башкатова Ю.Н., Хаитов М.Р. Биологические модели Ig-E-зависимой бронхиальной астмы: методологические особенности и перспективы применения. *Вестник РАМН*. 2010; 7: 22—8.
2. Крючков Н.А., Бабахин А.А., Башкатова Ю.Н., Козмин Л.Д., Барсигян Г.Г., Хаитов М.Р., Мартынов А.И. Краткосрочная безадывантная модель IgE-зависимой бронхиальной астмы у лабораторных мышей с использованием аллергена пыльца тимофеевки. *Российский аллергологический журнал*. 2008; 4: 37—45.
3. Karganov M.Yu., Alchinova I.B., Arkhipova E.N., Skalny A.V. Laser Correlation Spectroscopy: Nutritional, Ecological and Toxic Aspects. In: «*Biophysics*». A.N. Misra ed. — In-Tech, 2012. — ISBN 978-953-51-0376-9. P.1—16.
4. Karganov M.Yu., Skalny A.V., Alchinova I.B., Khlebnikova N.N., Grabeklis A.R. 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; 28 (2): 124—7
5. Бажора Ю.И., Носкин Л.А. *Лазерная корреляционная спектроскопия в медицине*. Одесса: Друк; 2002.
6. Титов В.Н., Карганов М.Ю., Ротенко А.А., Дмитриев В.А., Алчинова И.Б., Архипова Е.Н. Биологические функции и биологические реакции. Лазерная корреляционная спектроскопия в оценке чистоты межклеточной среды — функции эндоекологии (лекция). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2009; 6: 21—36.
7. Карганов М.Ю., Киселев М.Ф., Комаров Г.Д., Куинжи Н.Н., Курнешова Л.Е., Кучма В.Р. и др. *Полисистемный саногенетический мониторинг*. М.: МИПКРО; 2001.

8. Ngoc P.L., Gold D.R., Tzianabos A.O., Weiss S.T., Celedyn J.C. Cytokines, allergy, and asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2005; Apr;5 (2): 161–6.

9. Schmidt-Weber C.B. Anti-IL-4 as a New Strategy in Allergy. *Chem. Immunol. Allergy.* 2012; 96: 120–5.

10. Ozdemir C., Akdis M., Akdis C.A. T-cell response to allergens. *Chem. Immunol. Allergy.* 2010; 95: 22–44.

11. Носкин Л.А., Пивоваров В.В., Хомич М.М., Довгуша В.В., Карганов М.Ю. Полисистемная оценка состояния саногенеза работников предприятия ядерно-топливного цикла. Анализ функционального состояния сердечно-сосудистой, дыхательной и психомоторной систем. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2004; 44 (3): 269–77.

12. Карганов М.Ю., Ковалева О.И., Хлебникова Н.Н., Дмитриева О.С., Саенко С.А., Довгуша Л.В., Ланда С.Б. Полисистемная оценка состояния саногенеза работников предприятия ядерно-топливного цикла. Анализ регуляции обменных процессов. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2004; 44(3): 251–61.

13. Алчинова И.Б., Вейко Н.Н., Дмитриева О.С., Ланда С.Б., Хлебникова Н.Н., Карганов М.Ю. Применение метода лазерной корреляционной спектроскопии для оценки метаболических сдвигов у работников радиационно-опасного производства. *Гигиена и санитария.* 2006; 5: 77–9.

14. Панкова Н.Б., Лебедева М.А., Курнешова Л.Е., Пивоваров В.В., Карганов М.Ю. Спираартериокардиоритмография — новый метод изучения состояния сердечно-сосудистой системы. *Патогенез.* 2003; 1(2): 84–8.

15. Панкова Н.Б., Надоров С.А., Ежова О.А., Агаджанян Н.А., Карганов М.Ю. Информативность различных функциональных проб состояния кардиореспираторной системы человека в норме и при патологии. *Вестник восстановительной медицины.* 2008; 1: 67–71.

References

1. Krjuchkov N.A., Bashkatova Ju.N., Haitov M.R. Biological models of Ig-E-dependent asthma: methodological features and application prospects. *Vestnik Rossijskoj AMN.* 2010; 7: 22–8. (in Russian)

2. Krjuchkov N.A., Babahin A.A., Bashkatova Ju.N., Kozmin L.D., Barsigian G.G., Haitov M.R., Martynov A.I. Short-term non-adjuvant model IgE-dependent asthma in laboratory mice using timothy pollen allergen. *Rossijskij allergologicheskij zhurnal.* 2008; 4: 37–45. (in Russian)

3. Karganov M.Yu., Alchinova I.B., Arkhipova E.N., Skalny A.V. Laser Correlation Spectroscopy: Nutritional, Ecological and Toxic Aspects. In: «*Biophysics*». A.N. Misra ed. — InTech, 2012. — ISBN 978-953-51-0376-9. P.1–16.

4. Karganov M.Yu., Skalny A.V., Alchinova I.B., Khlebnikova N.N., Grabeklis A.R. 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; 28 (2): 124–7

5. Bazhora Ju.I., Noskin L.A. *Laser correlation spectroscopy in medicine.* Odessa: Druk; 2002. (in Russian)

6. Titov V.N., Karganov M.Ju., Rotenko A.A., Dmitriev V.A., Alchinova I.B., Arhipova E.N. Biological functions and biological reactions. Laser correlation spectroscopy in the evaluation of the purity of the intercellular medium — Endoecology functions (lecture). *Klinicheskaja laboratornaja diagnostika.* 2009; 6: 21–36. (in Russian)

7. Karganov M.Ju., Kiselev M.F., Komarov G.D., Kuinzi N.N., Kurmeshova L.E., Kuchma V.R. i dr. *Polysystemic sanogenetic monitoring.* M.: MIPKRO; 2001. (in Russian)

8. Ngoc P.L., Gold D.R., Tzianabos A.O., Weiss S.T., Celedyn J.C. Cytokines, allergy, and asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2005; Apr;5 (2): 161–6.

9. Schmidt-Weber C.B. Anti-IL-4 as a New Strategy in Allergy. *Chem. Immunol. Allergy.* 2012; 96: 120–5.

10. Ozdemir C., Akdis M., Akdis C.A. T-cell response to allergens. *Chem. Immunol. Allergy.* 2010; 95: 22–44.

11. Noskin L.A., Pivovarov V.V., Homich M.M., Dovgusha V.V., Karganov M.Ju. Polysystemic assessment of the sanogenesis employees of the nuclear fuel cycle. Analysis of the functional state of the cardiovascular, respiratory and psychomotor systems. *Radiacionnaja biologija. Radiojelogija.* 2004; 44 (3): 269–77. (in Russian)

12. Karganov M.Ju., Kovaleva O.I., Hlebnikova N.N., Dmitrieva O.S., Saenko S.A., Dovgusha L.V., Landa S.B. Polysystem assessment sanogenesis employees of the nuclear fuel cycle. Analysis of the regulation of metabolic processes. *Radiacionnaja biologija. Radiojelogija.* 2004; 44 (3): 251–61. (in Russian)

13. Alchinova I.B., Vejko N.N., Dmitrieva O.S., Landa S.B., Hlebnikova N.N., Karganov M.Ju. Application of laser correlation spectroscopy to assess metabolic changes in workers radiation-hazardous production. *Gigiena i sanitarija.* 2006; 5: 77–9. (in Russian)

14. Pankova N.B., Lebedeva M.A., Kurmeshova L.E., Pivovarov V.V., Karganov M.Ju. Spiro-arteriovenous cardiorythmography — a new method of studying the state of the cardiovascular system. *Patogenez.* 2003; 1(2): 84–8. (in Russian)

15. Pankova N.B., Nadorov S.A., Ezhova O.A., Agadzhanjan N.A., Karganov M.Ju. Evaluation of different functional tests of status human cardiorespiratory system in health and disease. *Vestnik vosstanovitel'noj mediciny.* 2008; 1: 67–71. (in Russian)

Поступила 27.06.14
Received 27.06.14

Сведения об авторах:

Алчинова Ирина Борисовна — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории полисистемных исследований ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАМН

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

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

Ежова Ольга Александровна — к.м.н., зам. главного врача центра традиционной и восстановительной медицины «Саккура»

Черепов Антон Борисович — научный сотрудник лаборатории нейробиологии памяти ФАНО «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина»

Карганов Михаил Юрьевич — д.б.н., профессор, зав. лабораторией полисистемных исследований ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАМН

Колесникова Л.И., Мадаева И.М., Семёнова Н.В., Гребенкина Л.А., Даренская М.А.

Оценка активности процессов перекисного окисления липидов у мужчин с обструктивными нарушениями дыхания во время сна в разных возрастных группах

Федеральное государственное бюджетное учреждение НЦ проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН, 664003, Иркутск, ул. Тимирязева, 16

В работе представлены результаты исследования состояния процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и дана оценка антиоксидантного статуса у 135 мужчин в возрасте от 14 до 55 лет с обструктивными нарушениями дыхания во время сна (ОНДС). Все пациенты были разделены на 4 возрастные группы: 14—17 лет, 18—22 года, 23—45 лет и 46—55 лет. Отмечена взаимосвязь между длительностью воздействия гипоксии при ОНДС со стадиями адаптации к данному патологическому состоянию.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, антиоксидантная защита, обструктивные нарушения дыхания во время сна, адаптация

Kolesnikova L.I., Madaeva I.M., Semenova N.V., Grebenkina L.A., Darenskaya M.A.

Evaluate the activity of lipid peroxidation in men with obstructive breathing disorders during sleep in different age groups

Scientific Centre of the Family Health and Human Reproduction Problems, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, 664003, Irkutsk, Russian Federation

The results of research on the state of lipid peroxidation (LPO) and the evaluation of the antioxidant status in 135 men aged 14 to 55 years with obstructive disorders of breathing during sleep (ONDS). The patients were divided into 4 age groups: 14—17 years, 18—22 years, 23—45 years and 46—55 years. Noting the relationship between the duration of hypoxia in ONDS the stages of adaptation to this pathological condition.

Key words: lipid peroxidation, antioxidant protection, obstructive disorders of breathing during sleep, adaptation

Энергетический обмен, необходимый для реализации огромного количества процессов, является ведущим метаболическим звеном жизнедеятельности клетки и поддерживается сложным комплексом процессов, главная роль в которых принадлежит окислительным реакциям. Соотношение активности окислительных процессов и антиоксидантной защиты не только отражает, но и во многом определяет интенсивность метаболизма, адаптационные возможности организма и риск формирования окислительного стресса [1]. В литературе имеются многочисленные сведения о функционировании системы ПОЛ-АОЗ в различных возрастных группах с учетом гендерного признака как у здоровых людей [2, 3], так и при различных патологических состояниях [1, 4—6]. В настоящее время большой интерес представляет изучение патологических состояний сна, наиболее часто

встречающимися из которых являются обструктивные нарушения дыхания во время сна (ОНДС) [7, 8]. В литературе ОНДС рассматривается во взаимосвязи с сердечно-сосудистыми заболеваниями [9—11], ожирением [12, 13], эректильной дисфункцией у мужчин [14, 15], болезнями почек [16], сахарным диабетом [17, 18]. Немаловажную роль отводят и изучению окислительного стресса у пациентов с ОНДС [19—21], так как имеющаяся при данном патологическом состоянии гипоксия вызывает изменения свободнорадикального гомеостаза [22—24]. Показано, что выраженность окислительного стресса находится во взаимосвязи со степенью тяжести ОНДС [25]. Однако, имеющихся в литературе данных о функциональном состоянии системы ПОЛ-АОЗ у пациентов с данным патологическим состоянием в возрастном аспекте недостаточно.

Цель исследования — изучение процессов липопероксидации и оценка антиоксидантной активности у мужчин с ОНДС в различных возрастных периодах.

Для корреспонденции: Семёнова Наталья Викторовна (Semenova N.V.), к.б.н., м.н.с. лаборатории патофизиологии репродукции ФГБУ «НЦ проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН, e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru

Методика

В исследовании приняли участие 135 пациентов в возрасте от 14 до 55 лет. Критериями включения пациентов в исследование были: храп в течение 6 мес. и более, утренняя головная боль, преимущественное повышение артериального давления в утренние часы, дневная сонливость, «неосвежающий силы сон», снижение концентрации внимания и памяти, снижение либидо, ночной диурез. В качестве модели оценки длительности клинических проявлений была принята следующая возрастная периодизация мужчин: 14—17 лет (подростки), 18—22 года (юноши), мужчины 23—45 лет (зрелость 1 периода) и 46—55 лет (зрелость 2 периода) (ВОЗ, 1965). Все пациенты были включены в исследование после подписания информированного согласия в соответствии с Хельсинкской Декларацией. После ночи адаптации в специально оснащенной лаборатории сна, условия в которой максимально приближены к домашним, всем обследуемым был проведен полисомнографический (ПСГ) мониторинг с использованием системы GRASS-TELEFACTOR Twin PSG (Comet) с усилителем As 40 с интегрированным модулем для сна (США). Наложение электродов и датчиков, монтаж и физиологическая калибровка, устранение возможных артефактов, определение и оценка стадий сна проводились в соответствии с международными рекомендациями и критериями американских экспертов [26].

В качестве материала для биохимических исследований использовали сыворотку крови. Спектрофотометрическими методами определяли содержание субстратов для процессов ПОЛ — соединений с изолированными двойными связями (Дв.св., усл. ед.) и продуктов процессов липопероксидации — диеновых ко-

ньюгатов (ДК, мкмоль/л), кетодиенов и сопряженных триенов (КД-СТ, усл. ед.) [27]. Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли в реакции с тиобарбитуровой кислотой флуориметрическим методом [28]. Антиоксидантный статус оценивали по уровню общей антиоксидантной активности сыворотки крови (АОА) [29]. Измерения проводили на спектрофлуорофотометре «SHIMADZU-1501» (Япония), состоящего из двух блоков: спектрофотометра UV-1650PC и спектрофлуориметра RF-1501.

Для анализа полученных данных использовали статистический пакет — Statistica 6.1 Stat-Soft Inc, США (правообладатель лицензии — ФГБУ «НЦ проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН). При анализе межгрупповых различий для независимых выборок использовали параметрический критерий Стьюдента и непараметрический критерий Манна—Уитни. Критический уровень значимости принимался равным 5% (0,05).

Результаты и обсуждение

Результаты исследований, характеризующие процессы ПОЛ у мужчин разных возрастных групп с ОНДС представлены на рис. 1—3. Как видно из полученных данных, активность процессов липопероксидации при ОНДС меняется с возрастом пациента. Так, содержание соединений с изолированными Дв.Св. в сыворотке крови юношей по сравнению с подростками уменьшилось в 1,8 раза ($p < 0,05$), затем к 23—46 годам статистически значимо увеличилось в 2,1 раза (рис. 1). Наибольшее значение этого показателя отмечается в возрасте 23—45 лет с последующим снижением к 46—55 годам. Концентра-

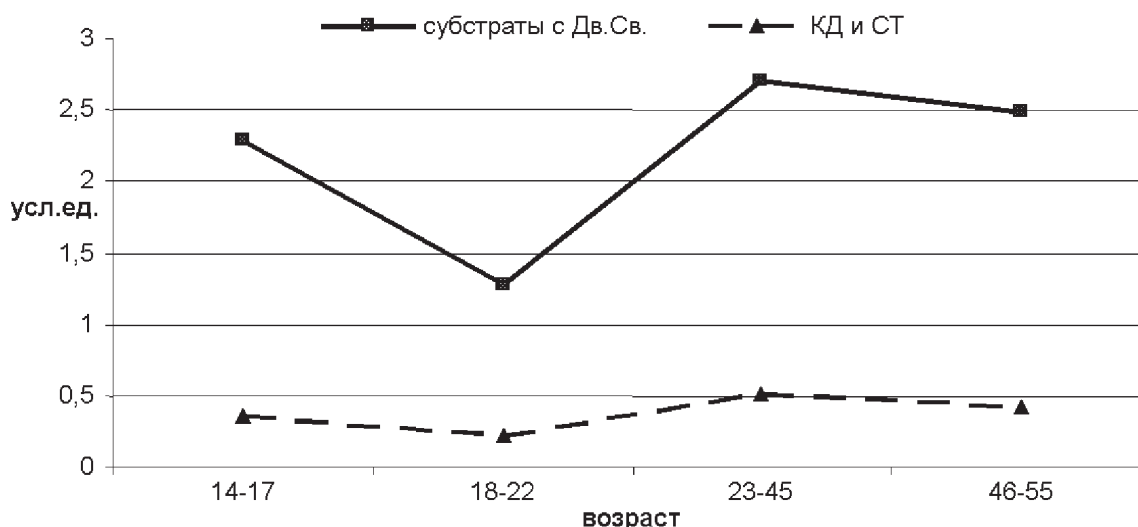


Рис. 1. Содержание соединений с изолированными Дв.Св. и КД и СТ в сыворотке крови мужчин с ОНДС в различных возрастных периодах: * — статистически значимые различия по сравнению с предшествующим возрастным периодом.

ция соединений с изолированными Дв.Св. может служить интегральным показателем интенсивности процессов ПОЛ. Чем меньше уровень соединений с изолированными Дв.Св., тем более интенсивно протекают процессы окисления субстратов.

Содержание ДК имеет также свои особенности в различные возрастные периоды (рис. 2). Так, в крови юношей по сравнению с подростками их содержание уменьшается в 2 раза ($p < 0,05$), затем к 23—45 годам увеличивается в 2,4 раза ($p < 0,05$), вновь снижаясь к 46—55 годам.

Содержание КД и СТ в крови юношей ниже в 1,6 раза ($p < 0,05$) по сравнению с подростками. К 23—45 годам их содержание увеличивается в 2,3 раза ($p < 0,05$) и снижается к 46—55 годам (рис. 1).

Содержание МДА в сыворотке крови с возрастом увеличивается (рис. 2). Так, в группе юношей содержание конечного продукта ПОЛ выше, чем в группе подростков в 1,3 раза ($p < 0,05$), а в группе мужчин 23—45 лет выше, чем в группе подростков в 1,5 раза ($p < 0,05$). Однако в группе мужчин 46—55 лет содержание МДА в сыворотке крови значительно снижается в 2,43 раза ($p < 0,05$) относительно группы мужчин 23—45 лет.

Таким образом, результаты нашего исследования указывают на определенную возрастную динамику активности процессов липопероксидации у мужчин с ОНДС. Как известно, интенсивность свободнорадикальных процессов контролируется многокомпонентной системой АОЗ, включающей в себя антиоксидан-

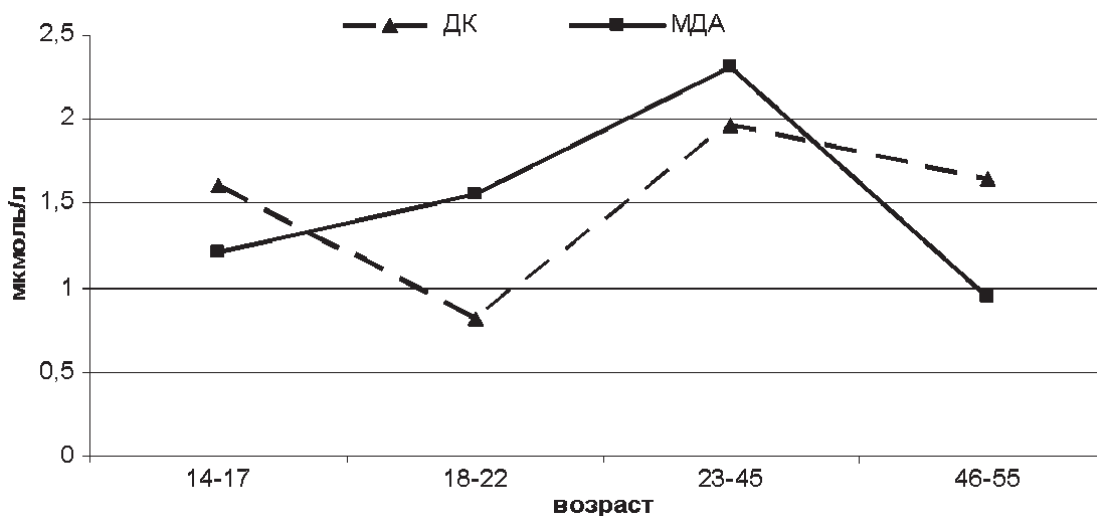


Рис. 2. Содержание ДК и МДА в сыворотке крови мужчин с ОНДС в различных возрастных периодах:
* — статистически значимые различия по сравнению с предшествующим возрастным периодом.

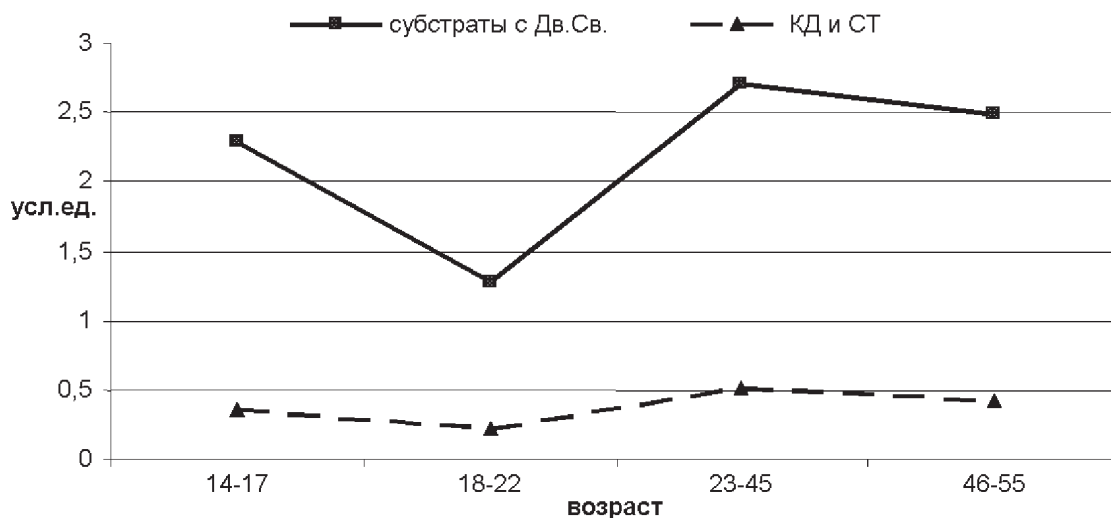


Рис. 3. Уровень общей АОА сыворотки крови у мужчин с ОНДС в различных возрастных периодах:
* — статистически значимые различия по сравнению с предшествующим возрастным периодом.

ты как ферментативной, так и неэнзимной природы. Интегративным показателем антиоксидантной защиты является общая АОО сыворотки крови. При оценке уровня общей АОО крови у пациентов различных возрастных групп, нами выявлено снижение ее уровня в группе юношей в 1,47 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой подростков (рис. 3). В 23—45 лет уровень общей АОО крови возрастает в 1,58 раза ($p < 0,05$) по сравнению с юношами. К 46—55 годам отмечена тенденция к снижению уровня данного показателя.

Известно, что гипоксия, возникающая при ОНДС и являющаяся стрессором при данном патологическом состоянии, вызывает изменения свободнорадикального гомеостаза, проявляющиеся в виде дефицита активных форм кислорода и активации процессов ПОЛ [30]. Стадию предклинических проявлений (14—17 лет) можно рассматривать как этап срочной адаптации, когда происходит мобилизация функциональных резервов. Возрастной период 18—22 года (стадия начальных проявлений) характеризуется наибольшей активностью процессов окисления субстратов ПОЛ по сравнению с возрастным периодом 14—17 лет, о чем свидетельствует более сниженный уровень соединений с изолированными Дв.Св. и более высокий уровень первичных продуктов ПОЛ. Однако содержание МДА у юношей статистически значимо ниже, чем у подростков. В дальнейшем, при нарастании длительности воздействия гипоксии и, соответственно, степени тяжести ОНДС отмечается снижение активности окисления субстратов ПОЛ с накоплением МДА и активизация системы АОЗ в группе мужчин 23—45 лет при средней степени нарушений дыхания во время сна. То есть, при усилении стрессирующего фактора осуществляется этап долговременной адаптации в данной возрастной группе. Таким образом, возрастной период 18—22 года можно расценивать как переходную стадию от срочной адаптации к устойчивой адаптации. При действии стрессирующего фактора в течение достаточно длительного времени (возраст 46—55 лет, тяжелая степень ОНДС) помимо снижения в крови высокотоксичного продукта ПОЛ — МДА никаких изменений по сравнению с предшествующим возрастным периодом не выявлено. Данная стадия может быть расценена как продолжение устойчивой адаптации. Однако, согласно теории стресса по Г. Селье, вслед за стадией устойчивой адаптации идет стадия истощения. Учитывая длительность и стадию ОНДС, данный возрастной период можно расценить как стадию истощения.

Работа выполнена при поддержке Совета по грантам Президента РФ (НШ — 494.2012.7).

Список литературы

1. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А. *Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания*. Новосибирск: АРТА; 2008.
2. Колесникова Л.И., Курашова Н.А., Гребенкина Л.А., Долгих М.И., Лабыгина А.В., Сутурина Л.В. и др. Особенности процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты у практически здоровых мужчин различных этнических групп. *Вестник военно-медицинской академии*. 2012; 3 (39): 134—7.
3. Колесникова Л.И., Даренская М.А., Гребенкина Л.А., Сутурина Л.В., Лабыгина А.В., Семенова Н.В. и др. Особенности состояния антиоксидантной системы у здоровых лиц основных этнических групп Прибайкалья. *Вопросы питания*. 2012; 81 (3): 46—51.
4. Колесникова Л.И., Осипова Е.В., Гребенкина Л.А. *Окислительный стресс при репродуктивных нарушениях эндокринного генеза у женщин*. Новосибирск: Наука; 2011.
5. Palmieri B., Sblendorio V. Oxidative stress detection: What for? *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2007; 11: 27—54.
6. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*. 2007; 2 (2): 219—36.
7. Полуэктов М.Г. Нарушения сна в молодом возрасте: инсомнии и расстройства дыхания во сне. *Лечащий врач*. 2011; 5. Available at: <http://www.lvrach.ru/2011/05/15435183>
8. Dempsey J.A., Veasey S.C., Morgan B.J., O'Donnell C.P. Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol. Rev.* 2010; 90 (1): 47—112.
9. Гордеев И.Г., Шайдюк О.Ю., Таратухин Е.О. Синдром апноэ во сне и кардиологическая патология: современный взгляд. *Российский кардиологический журнал*. 2012; 6 (98): 5—11.
10. Drager L., Polotsky V.Y., Lorenzi-Filho G. OSA: an emerging risk factor for atherosclerosis. *Chest*. 2011; 140 (2): 534—42.
11. Fava C., Montagnana M., Favalaro E.J., Guidi G.C., Lippi G. Obstructive sleep apnea syndrome and cardiovascular diseases. *Semin. Thromb. Hemost.* 2011; 37 (3): 280—97.
12. Свиричев Ю.В. Синдром обструктивного апноэ во сне у больных с артериальной гипертензией и ожирением. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2010; 2: 26
13. Schwartz A.R., Patil S.P., Laffan A.M., Polotsky V., Schneider H., Smith P.L. Obesity and obstructive sleep apnea: pathogenic mechanisms and therapeutic approaches. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2008; 5: 185—92.
14. Jankowski J.T., Seftel A.D., Strohl K.P. Erectile dysfunction and sleep related disorders. *J. Urol.* 2008; 179 (3): 837—41.
15. Giannitsas K., Perimenis P. Erectile dysfunction and obstructive sleep apnoea — the urologists perspective. *European Urological Review*. 2009; 4 (1): 60—3.
16. Mirrakhimov A.E. Obstructive sleep apnea and kidney disease: is there any direct link? *Sleep and Breathing*. 2012; 16 (4): 1009—16.
17. Clarenbach C.F., West S.D., Kohler M. Is obstructive sleep apnea a risk factor for diabetes? *Discov. Med.* 2011; 12 (62): 17—24.
18. Pamidi S., Tasali E. Obstructive sleep apnea and type 2 diabetes: is there link? *Frontiers in Neurology*. 2012; 3 (126): 1—13.
19. Мадаева И.М., Колесникова Л.И., Петрова В.А., Шевырталова О.Н., Шолохов Л.Ф. Изменения процес-

сов перекисного окисления липидов и системы антиокислительной защиты у пациентов с синдромом обструктивного апноэ сна. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2009; 3: 24–7.

20. Wang L., Li J., Xie Y., Zhang X.G. Association between serum homocysteine and oxidative stress in elderly patients with obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome. *Bio-med. Environ. Sci.* 2010; 23 (1): 42–7.

21. Simiakakis M., Kapsimalis F., Chaligiannis E., Loukides S., Sitaras N., Alchanatis M. Lack of effect of sleep apnea on oxidative stress in obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) patients. *PLoS One*. 2012; 7(6):e39172. Available at: doi: 10.1371/journal.pone.0039172. (Epub 25 Jun 2012).

22. Zhang J., Veasey S. Making sense of oxidative stress in obstructive sleep apnea: mediator or distracter? *Front Neurol*. 2012; 3:179. doi: 10.3389/fneur.2012.00179. (Epub 27 Dec 2012).

23. Lavie L. Oxidative stress inflammation and endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012; 4: 1391–403.

24. Atkeson A., Jelic S. Mechanisms of endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea. *Vascular Health and Risk Management*. 2008; 4 (6): 1327–35.

25. Franco C.M., Lima A.M., Ataide L.Jr., Lins O.G., Castro C.M., Bezerra A.A. et. al. Obstructive sleep apnea severity correlates with cellular and plasma oxidative stress parameters and affective symptoms. *J. Mol. Neurosci*. 2012; 47 (2): 300–10.

26. Rechtschaffen A., Kales A. *Manual of Standardized Terminology, Techniques, and Criteria for the Scoring of Stages of Sleep and Wakefulness of Human Subjects*. NIH publication No 204. Washington, DL: US Government Printing Office, 1968.

27. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови. *Вопр. мед. химии*. 1989; (1): 127–31.

28. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой. *Вопр. Мед. химии*. 1987; 1: 118–22.

29. Клебанов Г.И., Бабенкова И.В., Теселкин Ю.О. Оценка АОА плазмы крови с применением желточных липопротеидов. *Лаб. дело*. 1988; 5: 59–60.

30. Carbonell T., Rama R. Respiratory hypoxia and oxidative stress in the brain. Is the endogenous erythropoietin an antioxidant? *Current Chemical Biology*. 2009; (3): 238–52.

References

1. Men'shnikova E.B., Zenkov N.K., Lankin V.Z., Bondar' I.A., Trufakin V.A. *Oxidative stress: pathological conditions and diseases*. Novosibirsk: ARTA; 2008 (in Russian).

2. Kolesnikova L.I., Kurashova N.A., Grebenkina L.A., Dolgih M.I., Labygina A.V., Suturina L.V. i dr. Features of lipid peroxidation and antioxidant defense system in healthy men of different ethnic groups. *Vestnik voenno-meditsinskoy akademii*. 2012; 3 (39): 134–7. (in Russian)

3. Kolesnikova L.I., Darenskaja M.A., Grebenkina L.A., Suturina L.V., Labygina A.V., Semenova N.V. i dr. Features state of antioxidant system in healthy individuals of the main ethnic groups of the Baikal region. *Voprosy pitaniya*. 2012; 81 (3): 46–51. (in Russian)

4. Kolesnikova L.I., Osipova E.V., Grebenkina L.A. *Oxidative stress in women with reproductive endocrine disorders*. Novosibirsk: Nauka; 2011 (in Russian).

5. Palmieri B., Sblendorio V. Oxidative stress detection: What for? *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2007; 11: 27–54.

6. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*. 2007; 2 (2): 219–36.

7. Polujektov M.G. Sleep disorders in young age: insomnia, and breathing disorders during sleep. *Lechashij vrach*. 2011; 5. Available at: <http://www.lvrach.ru/2011/05/15435183>.

8. Dempsey J.A., Veasey S.C., Morgan B.J., O'Donnell C.P. Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol. Rev*. 2010; 90 (1): 47–112.

9. Gordeev I.G., Shajdjuk O.Ju., Taratuhin E.O. Sleep apnea and cardiac pathology: a contemporary look. *Rossijskij kardiologicheskij zhurnal*. 2012; 6(98): 5–11. (in Russian)

10. Drager L., Polotsky V.Y., Lorenzi-Filho G. OSA: an emerging risk factor for atherosclerosis. *Chest*. 2011; 140 (2): 534–42.

11. Fava C., Montagnana M., Favalaro E.J., Guidi G.C., Lippi G. Obstructive sleep apnea syndrome and cardiovascular diseases. *Semin. Thromb. Hemost.* 2011; 37 (3): 280–97.

12. Svirjaev Ju.V. Obstructive sleep apnea in patients with hypertension and obesity. *Mizhnarodnij endokrinologichnij zhurnal*. 2010; 2:26/ (in Russian)

13. Schwartz A.R., Patil S.P., Laffan A.M., Polotsky V., Schneider H., Smith P.L. Obesity and obstructive sleep apnea: pathogenic mechanisms and therapeutic approaches. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2008; 5: 185–92.

14. Jankowski J.T., Seftel A.D., Strohl K.P. Erectile dysfunction and sleep related disorders. *J. Urol*. 2008; 179 (3): 837–41.

15. Giannitsas K., Perimenis P. Erectile dysfunction and obstructive sleep apnoea — the urologists perspective. *European Urological Review*. 2009; 4 (1): 60–3.

16. Mirrakhimov A.E. Obstructive sleep apnea and kidney disease: is there any direct link? *Sleep and Breathing*. 2012; 16 (4): 1009–16.

17. Clarenbach C.F., West S.D., Kohler M. Is obstructive sleep apnea a risk factor for diabetes? *Discov. Med.* 2011; 12(62): 17–24.

18. Pamidi S., Tasali E. Obstructive sleep apnea and type 2 diabetes: is there link? *Frontiers in Neurology*. 2012; 3 (126): 1–13.

19. Madaeva I.M., Kolesnikova L.I., Petrova V.A., Shevrytalova O.N., Sholohov L.F. Changes in lipid peroxidation and antioxidant defense system in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja terapija*. 2009; 3: 24–7. (in Russian)

20. Wang L., Li J., Xie Y., Zhang X.G. Association between serum homocysteine and oxidative stress in elderly patients with obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome. *Bio-med. Environ. Sci.* 2010; 23 (1): 42–7.

21. Simiakakis M., Kapsimalis F., Chaligiannis E., Loukides S., Sitaras N., Alchanatis M. Lack of effect of sleep apnea on oxidative stress in obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) patients. *PLoS One*. 2012; 7(6):e39172. Available at: doi: 10.1371/journal.pone.0039172. (Epub 25 Jun 2012).

22. Zhang J., Veasey S. Making sense of oxidative stress in obstructive sleep apnea: mediator or distracter? *Front Neurol*. 2012; 3:179. doi: 10.3389/fneur.2012.00179. (Epub 27 Dec 2012).

23. Lavie L. Oxidative stress inflammation and endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea. *Front Biosci. (Elite Ed.)*. 2012; 4: 1391—403.

24. Atkeson A., Jelic S. Mechanisms of endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea. *Vascular Health and Risk Management*. 2008; 4 (6): 1327—35.

25. Franco C.M., Lima A.M., Ataide L.Jr., Lins O.G., Castro C.M., Bezerra A.A. et. al. Obstructive sleep apnea severity correlates with cellular and plasma oxidative stress parameters and affective symptoms. *J. Mol. Neurosci*. 2012; 47 (2): 300—10.

26. Rechtschaffen A., Kales A. *Manual of Standardized Terminology, Techniques, and Criteria for the Scoring of Stages of Sleep and Wakefulness of Human Subjects*. NIH publication No 204. Washington, DL: US Government Printing Office, 1968.

27. Volchegorskij I.A., Nalimov A.G., Jarovinskij B.G. A comparison of different approaches to the definition of lipid

peroxidation products in the heptane-isopropanol extracts of blood. *Vopr. Med. himii*. 1989; (1): 127—31. (in Russian)

28. Gavrilov V.B., Gavrilova A.R., Mazhul' L.M. Analysis methods for determining lipid peroxidation products in the blood serum test with thiobarbituric acid. *Vopr. med. himii*. 1987; 1: 118—22. (in Russian)

29. Klebanov G.I., Babenkova I.V., Teselkin Ju.O. Evaluation of antioxidant activity of blood plasma with the use of yolk lipoprotein. *Lab. delo*. 1988; 5: 59—60. (in Russian)

30. Carbonell T., Rama R. Respiratory hypoxia and oxidative stress in the brain. Is the endogenous erythropoietin an antioxidant? *Current Chemical Biology*. 2009; (3): 238—52.

Поступила 30.05.13

Received 30.05.13

Сведения об авторах:

Колесникова Любовь Ильинична (Kolesnikova L.I.) — член-корр. РАМН, профессор, директор ФГБУ «НЦ проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН, г.Иркутск, e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru

Мадаева Ирина Михайловна (Madaeva I.M.) — д.м.н., руководитель сомнологического центра ФГБУ «НЦ проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН, e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru

Гребенкина Людмила Анатольевна (Greibenkina L.A.) — к.б.н., с.н.с. лаборатории патофизиологии репродукции ФГБУ «НЦ проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН, e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru

Даренская Марина Александровна (Darenskaya M.A.) — к.б.н., с.н.с. лаборатории патофизиологии репродукции ФГБУ «НЦ проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН, e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru

Арокина Н.К., Иванов К.П.

Восстановление респираторной функции организма после холодового угнетения без отогревания

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

В экспериментах на крысах изучали влияние внутривенного введения $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ на дыхательную функцию крыс после полного прекращения дыхания при глубокой гипотермии. Показано, что таким методом без применения отогревания можно снизить на $1,5\text{--}2,0^\circ\text{C}$ температурный порог наступления полного холодового паралича дыхательной функции организма. Это подтверждает выдвинутую ранее гипотезу о важной роли нарушения баланса ионов кальция в цитоплазме клеток в развитии патологии организма при глубокой гипотермии. Полученные результаты могут быть использованы при реанимации жертв эксцидентальной гипотермии.

Ключевые слова: гипотермия, восстановление дыхания, ионы кальция, $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$

Arokina N.K., Ivanov K.P.

Restoration of respiratory function of an organism after cold oppressions without warming

FGBUN Institute of physiology of I.P. Pavlov, The Russian Academy of Sciences, 199034, St.-Petersburg, emb. Makarova, 6

In experiments on rats studied influence of intravenous introduction $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ on respiratory function of rats after the full termination of breath at deep hypothermia. It is shown that such method without warming application it is possible to lower on $1,5\text{--}2,0^\circ\text{C}$ a temperature threshold of approach full a cold paralysis of respiratory function of an organism. It confirms the hypothesis put forward earlier about an important role of infringement of balance of ions of calcium in cytoplasm of cells in development of a pathology of an organism at deep hypothermia. The received results can be used at resuscitation of victims accidental hypothermia

Key words: hypothermia, restoration breathing, $[\text{Ca}^{2+}]$, Na_2EDTA

Реанимация переохлажденного организма с применением отогревания довольно опасная процедура и часто заканчивается гибелью организма. Поэтому представляется важной разработка других методов выведения организма из глубокой гипотермии, когда функции дыхательного и сосудодвигательного центров головного мозга значительно угнетены. Охлаждение тела угнетает деятельность АТФазы — фермента участвующего в синтезе АТФ [1]. Возникает недостаток энергии, что тормозит процесс выведения из клетки избытка ионов кальция. Транспорт одного иона кальция стоит расщепления одной молекулы АТФ [2], это очень большой расход энергии. Накопление Ca^{2+} в цитоплазме, как известно, дезорганизует метаболизм клетки. Имеются данные, что толерантность животных к холоду повышается при уменьшении содержания ионов кальция в крови [3]. На основе этих фактов в экспериментах на крысах мы разработали метод активизации терморегуляторной и дыха-

тельной функций при гипотермии, не используя отогревание. Внутривенное введение охлажденным животным небольшой дозы (0,013—0,016 ммоль) динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты ($\text{Na}_2\text{ЭДТА}$) снизило уровень $[\text{Ca}^{2+}]$ в крови крыс на 15—30% и вызвало усиление холодовой дрожи, повышение частоты и амплитуды дыхания [4—7].

Ранее нами показана возможность восстановления дыхания у крыс после его длительной остановки при температуре тела $15,2 \pm 0,3^\circ\text{C}$ и мозга $16,6 \pm 0,3^\circ\text{C}$ [8].

Цель исследования — выяснение являются ли эти температуры предельными для сохранения функций дыхательного центра, и возможно ли восстановление дыхания с помощью введения в кровяное русло $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ при более низких температурах тела и мозга.

Методика

Опыты проводились на 13 белых крысах-самцах Вистар массой 320 ± 15 г. После наркотизации (небутал, 40 мг/кг, внутривенно) животные фиксировались на специальном станке. В бедренные вены и артерию вводились полиэтиленовые катетеры для

Для корреспонденции: Арокина Надежда Константиновна, д.биол.н., б/зв, ст. науч. сотр., группа физиологии терморегуляции и биоэнергетики ИФ РАН, e-mail: termo@pavlov.infran.ru

инъекций, взятия проб крови, измерения кровяного давления. Температуру в прямой кишке и в области продолговатого мозга (на глубине 7 мм) измеряли с помощью медно-константановых термопар. Через 2—2,5 ч после операции крысы погружали в холодную воду (9—10°C), голова находилась над уровнем воды. Регистрировали пневмограмму (угольный датчик), электрокардиограмму (ЭКГ), кровяное давление.

Через 2—3 мин после остановки дыхания крыс извлекали из воды и для дополнительного снижения температуры тела их накрывали мокрой тканью и кусочками льда при температуре воздуха в комнате 18—20°C. Через 6—8 мин после извлечения из воды животным опытной группы ($n = 6$) через бедренную вену в течение 4 мин в кровь вводили 1 мл 0,5% раствора $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ (0,0135 ммоль). В контрольных опытах ($n = 7$) через 2—3 мин после остановки дыхания животное извлекали из воды и регистрировали физиологические параметры до гибели крыс.

Концентрацию ионов кальция в цельной крови определяли методом прямой потенциометрии пленочными кальций-селективными электродами на основе диоктилфенилфосфорной кислоты. Пробы крови (по

0,3 мл) брали до охлаждения животных, сразу после извлечения из воды, на 8-й и на 60-й мин после начала введения $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «Statistica», вычисляли средние значения (M), ошибку среднего (m); значимость различий определяли по критерию Вилкоксона (ρ_w).

Результаты и обсуждение

Время охлаждения крыс составляло 72 ± 11 мин. После извлечения крыс из воды температура тела и мозга продолжала понижаться. В табл. 1 приведены физиологические параметры для всех исследованных крыс до охлаждения и при остановке дыхания.

У животных опытной группы ($n = 6$) к 8-й мин после начала инъекции $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ содержание Ca^{2+} в крови снизилось на 28% от уровня измеренного до введения препарата, что сопровождалось восстановлением и постепенным учащением дыхания (табл. 2). При этом температура мозга и в прямой кишке были на 1,5—2,0°C ниже, чем при остановке дыхания ($\rho_w < 0,05$).

Таблица 1

Физиологические параметры крыс до охлаждения в воде и при остановке дыхания ($n = 13$)

Этап опыта	Ректальная температура, °C	Температура мозга, °C	Артериальное давление, мм рт.ст.	Частота дыхания, циклов/мин	Частота сердечных сокращений, уд./мин	[Ca ²⁺] в крови, ммоль/л
Исходные	36,7 ± 0,5	36,2 ± 0,4	94 ± 7	88 ± 2	475 ± 10	1,03 ± 0,02
Остановка дыхания	14,8 ± 0,5	16,0 ± 0,3	37 ± 5	0	42 ± 4	
Перед введением $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$	13,5 ± 0,4	15,2 ± 0,3	26 ± 4	0	36 ± 2	1,21 ± 0,03

Таблица 2

Физиологические параметры крыс через разное время после начала введения $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ ($n = 6$)

Время от начала введения $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, мин	Ректальная температура, °C	Температура мозга, °C	Артериальное давление, мм рт.ст.	Частота дыхания, циклов/мин	Частота сердечных сокращений, уд./мин	[Ca ²⁺] в крови, ммоль/л
8	12,8 ± 0,5	14,8 ± 0,3	28 ± 5	5 ± 2	40 ± 4	0,87 ± 0,05
20	12,3 ± 0,6	14,7 ± 0,4	35 ± 3	7 ± 1	45 ± 5	
40	12,4 ± 0,7	14,8 ± 0,4	33 ± 3	10 ± 2	49 ± 4	
60	12,2 ± 0,7	14,9 ± 0,3	43 ± 6	12 ± 3	57 ± 7	1,07 ± 0,04

Таблица 3

Физиологические параметры контрольных крыс через разное время после извлечения из воды ($n = 7$)

Время от извлечения из воды, мин *	Ректальная температура, °C	Температура мозга, °C	Артериальное давление, мм рт.ст.	Частота дыхания, циклов/мин	Частота сердечных сокращений, уд./мин	[Ca ²⁺] в крови, ммоль/л
8(+6)	13,4 ± 0,6	14,8 ± 0,2	16 ± 6	0	21 ± 5	1,26 ± 0,04
20(+6)	13,3 ± 0,7	14,9 ± 0,5	5 ± 2	0	14 ± 6	
40(+6)	13,2 ± 0,6	14,7 ± 0,5	0	0	0	

Примечание. * — время регистрации физиологических параметров соответствует времени в табл. 2 для опытных крыс, с учетом 6 мин от момента извлечения животных из воды до начала введения $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$



Регистрация частоты сердечных сокращений («ЭКГ») и дыхания в одном из опытов:

1 – 8-я мин от начала введения $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$: Тр 11,6; Тм 14,8; ЧД 0; ЧСС 35; АД 10;

2 – 20-я мин: Тр 10,5; Тм 15,3; ЧД 10; ЧСС 54; АД 22;

3 – 40-я мин: Тр 11,5; Тм 15,4; ЧД 16; ЧСС 58; АД 38;

4 – 60-я мин: Тр 13,2; Тм 15,6; ЧД 24; ЧСС 63; АД 66.

Тр – температура в прямой кишке, °С; Тм – температура мозга, °С; ЧД – частота дыхания, циклов/мин; ЧСС – частота сердечных сокращений, уд./мин; АД – артериальное давление, мм рт.ст. Внизу – время (с).

Первые дыхательные движения появлялись через 4—6 мин после внутривенного введения $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$. Поскольку дыхание отсутствовало у крыс до введения препарата, общее время отсутствия дыхательных движений составило 13 ± 3 мин. Концентрация ионов кальция в крови крыс через час после введения $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ была ниже уровня ($p_w < 0,01$), который наблюдался сразу после остановки дыхания, но примерно соответствовала уровню $[\text{Ca}^{2+}]$, измеренному до охлаждения. Через 3 ч после извлечения из воды у опытной группы крыс ректальная температура была $13,4 \pm 0,6^\circ\text{C}$, мозга $16,0 \pm 0,4^\circ\text{C}$, артериальное давление 50 ± 6 мм рт.ст., частота дыхания 28 ± 7 циклов/мин, частота сердечных сокращений 63 ± 5 уд./мин. Все эти животные выжили путем саморазогревания. На рисунке представлены записи пневмограммы и электрокардиограммы для одной из крыс, сделанные через 8, 20, 40 и 60 мин после введения $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$.

У контрольных животных ($n = 7$) после остановки дыхания и извлечения их из воды дыхание не восстановилось, артериальное давление уже к 20-й мин упало почти до нуля, крысы погибли (табл. 3).

Проведенные исследования выявили, что животные после внутривенного введения $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ восстанавливают дыхание даже при более низкой температуре мозга ($14,7 \pm 0,4^\circ\text{C}$) и в прямой кишке ($12,3 \pm 0,6^\circ\text{C}$), чем в момент остановки дыхания ($16,0 \pm 0,3^\circ\text{C}$ и $14,8 \pm 0,5^\circ\text{C}$ соответственно). В одном из опытов физиологические параметры поддерживались на высоком уровне при температуре тела около 10°C . Контрольные животные через 30—40 мин от момента остановки дыхания погибли. С помощью введения животным в кровяное русло $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ нам удалось при смертельной температуре тела ($10—13^\circ\text{C}$) и мозга ($14—15^\circ\text{C}$) для млекопитающего животного поддерживать определенный уровень легочного дыхания, кровяного давления и частоты сокращения сердца в течение нескольких часов.

С научной точки зрения эти результаты интересны и заслуживают дальнейших исследований, поскольку, снижая уровень $[\text{Ca}^{2+}]$ в крови, удается отодвигать нижнюю температурную границу жизни в сторону более низких температур. Известно, что некоторые млекопитающие («зимнеспящие») имеют механизмы защиты клеток от кальциевой перегрузки, возникающей при гипоксии и гипотермии; они сохраняют дыхание, работу сердца при температурах близких к 0°C [9, 10]. Нам удалось найти способ стимулировать дыхание и поддерживать работу сердца без применения согревания тела у незимнеспящих животных. Опасность согревания переохлажденного организма состоит в том, что при повыше-

нии температуры тела быстро возрастает потребность тканей организма, особенно мозга и сердца, в энергии. Однако при отсутствии дыхания и ослабления деятельности сердца повышение снабжения тканей энергией невозможно. Наш подход основан на том, что раствор $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ образует комплексное соединение с ионами кальция, уменьшает их концентрацию в крови и, соответственно, в клетках. А это, как мы полагаем, замедляет патологическое повышение внутриклеточной концентрации ионов кальция выше базового уровня, замедляя тем самым развитие холодового стресса в клетках головного мозга. Нарушения обмена Ca^{2+} в клетках играют важнейшую роль в развитии патологии и гибели организма при гипотермии [1].

Известно, что $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ образует комплексы и с ионами магния, имеющими важное физиологическое значение, но ионы кальция связываются в первую очередь [11]. Мы не измеряли концентрацию ионов магния в крови, но полагаем, что вводимые нами дозы $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ не приводили к критическому снижению концентрации ионов магния в крови, что могло вызвать развитие аритмии, замедление дыхания и его остановку. В наших опытах наблюдалось повышение частоты дыхания, нормализация работы сердца, что доказывает эффективность применения динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты для восстановления дыхания при глубокой гипотермии. Кроме того, ранее нами была выявлена корреляция активизации дыхания с понижением $[\text{Ca}^{2+}]$ в крови [6].

В дальнейшем мы планируем продолжить поиск способов еще большего снижения температурного порога прекращения дыхания, поскольку это позволит разрабатывать методы реанимации человека при очень сильной степени охлаждения. Полученные результаты уже сейчас имеют важное практическое значение, и наш метод может быть рекомендован для поддержания жизни у жертв эксцидентальной гипотермии.

Список литературы

1. Hochachka P.W., Somero G.N. *Strategies of biochemical adaptation*. W.B. Sanders Company. London. 1973.
2. Carafoli E. The calcium pumping ATPase of the plasma membrane. *Ann. Rev. Physiol.* 199; Vol. 53: 531—47.
3. Hochachka P.W. Defence strategies against hypoxia and hypothermia. *Science*. 1986; 231 (4755): 234—41.
4. Иванов К.П., Арокина Н.К., Волкова М.Ф. и др. Блокада механизмов холодового паралича физиологических функций. *Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова*. 2000; 86 (6): 692—702.

5. Иванов К.П. Проблема восстановления физиологических функций у человека при глубокой эксиден- тальной гипотермии (к вопросу о пределах физиологи- ческой адаптации). *Физиология человека*. 2002; 28 (3): 123–30.

6. Федоров Г.С., Арокина Н.К., Иванов К.П. Механиз- мы угнетения физиологических функций при гипотермии и способ их стимуляции без отогревания тела. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2006; 92 (11): 1373–81.

7. Ivanov K.P. Restoration of vital activity of cooled ani- mals without rewarming the body. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2009; 105 (1): 5–12.

8. Иванов К.П., Арокина Н.К., Федоров Г.С. Холо- довая патология и экспериментальная терапия глубокой гипотермии. *Патол. физиол. и exper. тер.* 2011; 4: 55–9.

9. Boutilier R.G. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. *J. Exp. Biol.* 200; — Vol. 204 (Pt 18): \6 P. 3171181.

10. Carey H.V., Andrews M.T., Martin S.L. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol. Rev.* 2003; Vol. 83: 1153–81.

11. Ляндберг Р.А., Саушкина Л.Н. *Лабораторный прак- тикум по общей и неорганической химии*. 2008; Ч.1, с. 37.

Поступила 04.02.13
Received 04.02.13

Сведения об авторах:

Иванов Кирилл Павлович — д.м.н., профессор, гл. науч. сотр., научный руководитель группы физиологии терморегуляции и биоэнергетики, заслуженный деятель науки РФ, ИФ РАН

Лебедева М.А.¹, Карганов М.Ю.¹, Козлова Ю.А.²,
Готовцева Г.Н.², Тумуров Д.А.², Гудкова А.А.², Гехт А.Б.²

Роль вегетативной дисфункции в патогенезе синдрома раздраженного кишечника

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

² — Государственное бюджетное учреждение здравоохранения г.Москвы «Научно-практический психоневрологический центр» Департамента здравоохранения г.Москвы, 115419, Москва, ул.Донская, 43

Статья посвящена сравнительной оценке вегетативных нарушений у больных различными формами синдрома раздраженного кишечника (СРК) с помощью клинических и инструментальных методов: опросника Вейна, расчета вегетативного индекса Кердо, исследования кожного симпатического потенциала, анализа вариабельности сердечного ритма (ВСР). Результаты исследования демонстрируют преобладание симпатикотонии у всех пациентов (более выраженное у больных СРК с запорами), повышение стресс-индекса и снижение чувствительности артериального барорефлекса. У больных СРК с диареей отмечается достоверное увеличение мощности спектра очень низкочастотного диапазона ВСР, снижение коэффициента дыхательной аритмии.

Ключевые слова: синдром раздраженного кишечника, вегетативная нервная система, кожный симпатический вызванный потенциал, вариабельность сердечного ритма

Lebedeva M.A.¹, Karganov M.Yu.¹, Kozlova Y.A.²,
Gotovtceva G.N.², Tumurov D.A.², Gudkova A.A.², Guekht A.B.²

The role of autonomic dysfunction in pathogenesis of irritable bowel syndrome

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

² — Moscow Research and Clinical Center for Neuropsychiatry of the Healthcare, Department, Russia, 115419, Moscow, Donskaya st., 43

This article presents the results of a comparative study of autonomic disorders in patients with different types of irritable bowel syndrome (IBS). We used several clinical and instrumental methods, including the Veyn questionnaire, Kerdo autonomic index, skin sympathetic response and heart rate variability analysis. The results show a prevalence of sympathetic tone in all groups of patients (more pronounced in IBS with constipation), as well as an elevated stress index and decreased arterial baroreflex sensitivity. In the IBS with diarrhea group there was a reliable increase of power spectral density at very low frequency and a lowered respiratory sinus arrhythmia.

Key words: irritable bowel syndrome, autonomic nervous system, skin sympathetic response, heart rate variability

Функциональная патология нижних отделов пищеварительного тракта сегодня занимает первое место среди гастроэнтерологических заболеваний в большинстве стран мира [1]. Наиболее распространенным в данной группе является синдром раздраженного кишечника (СРК) — многофакторное, гетерогенное заболевание, в развитии которого играют роль перенесенные острые кишечные инфекции, изменение состава микрофлоры желудочно-кишечного тракта, пищевая аллергия, полиморфизм генов, отвечающих за моноаминовый обмен, а также изменения в психоэмоциональной сфере [2, 3, 4].

Большое значение в патогенезе заболевания придается состоянию ЦНС, поэтому СРК рассматривается как биопсихосоциальная патология, связанная с нарушением регуляции кишечных функций со стороны высших нервных центров в ответ на стрессовое воздействие [5].

При лабильной нервной системе кишечник часто становится органом-мишенью, реализующим нарушение взаимодействия между мозгом и висцеральными органами в силу его индивидуальных анатомо-физиологических особенностей [6]. В ряде случаев, первичный очаг раздражения возникает в самом желудочно-кишечном тракте, длительная патологическая импульсация от висцеральных рецепторов формирует застойное возбуждение в вегетативной нервной системе (ВНС), которое поддерживает дисфункцию органа [7]. Таким образом, происходит формирование па-

Для корреспонденции: Лебедева Марина Андреевна, к.б.н., вед. н.с. лаборатории полисистемных исследований, ФГБУ «НИИ ОПП» РАМН, e-mail: labpolys@gmail.com

тологической системы, которая со временем становится чувствительной к большому количеству внешних и внутренних раздражителей, снижается болевой порог, меняется восприятие болевой ощущения [8, 9], а изменения в эмоциональной и личностной сфере больного поддерживают и усиливают этот процесс.

Увеличение числа пациентов с СРК происходит в тесной взаимосвязи с распространением психических заболеваний невротического уровня, которые всегда сопровождаются полисистемными вегетативными дисфункциями [10].

Нарушения вегетативной регуляции при СРК подтверждается большинством исследователей [2, 5, 9], но их роль в генезе и течении синдрома изучена недостаточно.

Цель исследования — изучение функционального состояния вегетативной нервной системы с помощью нескольких различных клинических и инструментальных методик у пациентов с разными формами проявления синдрома раздраженного кишечника.

Методика

В НПЦ психоневрологии за период с 2011 по 2013 г. пролечено 698 пациентов с СРК. Из них 128 женщин методом случайной выборки включены в исследование взаимосвязи изменений в вегетативной сфере и характера течения заболевания. В свою очередь, 59 из них (47%) имели форму СРК с преобладанием диареи (СРК-Д) и у 69 (53%) отмечался СРК с преобладанием запоров (СРК-З). Возраст больных в среднем составил $41,2 \pm 11,7$ года. В исследование отбирали пациенток с верифицированным диагнозом, отмечавших постоянные нарушения стула на протяжении последних 12 мес. (и более), выраженные боли в животе, неэффективность лечения препаратами, стандартно используемыми в гастроэнтерологии (спазмолитики, синтетические аналоги энкефалина, антидиарейные и слабительные средства, пре- и пробиотики). Средняя длительность заболевания составила $9,3 \pm 4,1$ года.

В клиническом аспекте проводили оценку болевого абдоминального синдрома по десятибалльной визуально-аналоговой шкале (ВАШ) и с помощью болевого опросника Мак-Гилла [11]. Параллельно регистрировался характер дефекации (по Бристольской шкале).

Выраженность тревожных и депрессивных изменений в психическом статусе пациентов оценивали с помощью Госпитальной шкалы тревоги и депрессии (HADS).

Учитывая высокую межличностную и индивидуальную вариабельность при изучении вегетативной сферы, использовали различные методики: «Вопрос-

ник для выявления признаков вегетативных изменений» [12], расчет вегетативного индекса Кердо, исследование вызванного кожного симпатического потенциала (ВКСП).

Для изучения выраженности и характера вегетативной дисфункции оценивали латентный период ВКСП, амплитуду первого и второго компонента, общий период кожно-гальванической реакции (КГР). Данные показатели позволяют оценить тонус вегетативной нервной системы, интенсивность вегетативной реакции, качество вегетативного регулирования [13].

Исследование ВКСП проведено у 52 больных: 29 пациенток с СРК-Д и 29 пациенток с СРК-З. Группу сравнения (контроль) составили 22 здоровых добровольца обоего пола, средний возраст $40,8 \pm 9,9$ года.

Интегральную оценку функционального состояния вегетативной нервной системы проводили с помощью метода спиреоартериокардиоритмографии (САКР) [14]. Прибор САКР производится ООО «ИНТОКС» (Санкт-Петербург), разрешен к применению Комитетом по новой медицинской технике Министерства здравоохранения РФ (регистрационное удостоверение №29/03020703/5869-04 от 29 января 2004 г.) и рекомендован для задач медицинской диагностики комитетом по новой технике МЗ РФ. Данным прибором производится одновременная непрерывная регистрация ЭКГ, значений периферического АД (пАД) и параметров дыхания. Программное обеспечение позволяет: сделать заключение о функции проводимости миокарда, проводить спектральный анализ вариабельности сердечного ритма (ВСР) и пАД, оценить барорефлекторную регуляцию [15]. В исследовании на приборе САКР приняли участие 33 пациентки: 16 из них с СРК-З и 17 пациенток с СРК-Д.

Анализировали следующие спектральные показатели ВСР: общую мощность спектра — ТР, мощность спектра в диапазоне высоких частот — HF, низких — LF и очень низких частот — VLF. Рассчитывали показатель симпато-вагального баланса LF/HF [16]. Аналогичные показатели рассчитывали для колебаний систолического и диастолического пАД (ТР_s, HF_s, LF_s и VLF_s; ТР_d, HF_d, LF_d и VLF_d).

Из статистических показателей вариабельности сердечного ритма в работе использовали SDNN, RMSSD и pNN50%, рассчитываемые по массиву кардиоинтервалов. Применяли также геометрический метод анализа ВСР. Вычисляли ИВР — индекс вегетативного равновесия, ПАПР — показатель адекватности процессов регуляции, ВПР — вегетативный показатель ритма, ИН — индекс напряжения регуляторных систем [17].

Для оценки парасимпатической составляющей регуляции ритма сердца использовали также пробу с глубоким медленным дыханием. Вычисляли коэффициент дыхательной аритмии ($K_{дых}$) как отношение длительности максимального R-R интервала к минимальному. Эта проба также была использована для измерения чувствительности артериального барорефлекса (BR) как независимого маркера вегетативной активности.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistika 7.0. В зависимости от типа распределения выборки достоверность различий между группами определяли с использованием критериев Манна—Уитни и Стьюдента.

Результаты и обсуждение

По данным опросника А.М. Вейна, среднее значение в группе СРК-З составило $37,1 \pm 4,2$ балла, в группе с СРК-Д составило $38,6 \pm 3,4$ балла, что указывает на наличие выраженной вегетативной дисфункции у больных в обеих группах.

При расчете вегетативного индекса Кердо, в группе СРК-З 12 чел. имели отрицательное значение индекса, что указывает на преобладание парасимпатической активности, 57 чел. — положительное (симпатикотония). В группе с диареей 28 больных имели отрицательное значение индекса, 29 — положительное, а 2 пациента — нулевое. Полученные данные представлены на рис. 1, который иллюстрирует преобладание симпатикотонии в обеих группах, однако при СРК с диареей она была менее выражена, а 3% больных имели эйтонический вегетативный тонус. Исходя из этих данных, можно предполагать, что у пациентов в группе СРК-З вегетативные изменения были более выражены, чем в группе СРК-Д.

Результаты, полученные при исследовании ВКСП (табл. 1), показали, что изменения времени латентного периода ВКСП у пациентов с СРК не отмечается. Амплитуда компонента А1, отражающая активность парасимпатического отдела ВНС, имеет тенденцию к снижению у больных СРК-З. Амплитуда компонента А2, отражающая активность симпатической составляющей вегетативного фона, в группе СРК-Д оказалась достоверно ниже, чем у больных с запорами и в группе контроля. Эти изменения указывают на относительную симпатикотонию в группе СРК-З. Отношение А1/А2 — показатель, демонстрирующий преобладание тонуса ВНС, был достоверно выше в группе СРК-Д по сравнению с контрольными значениями и с группой СРК-З. Это свидетельствовало о преобладании парасимпатических вегетативных влияний в группе больных с диареей. Наши результаты согласуются с данными литературы [9, 18]. Повышение симпатической активности у больных с различными формами СРК также обнаруживали при исследовании реакции электрической проводимости кожи [19].

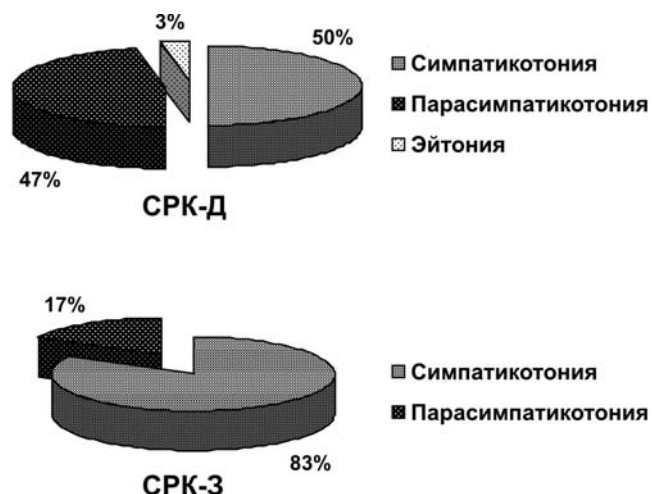


Рис. 1. Соотношение симпатикотонии, парасимпатикотонии и эйтонии в различных группах СРК (по данным индекса Кердо).

Анализируя данные ВКСП, полученные в настоящем исследовании, можно предположить, что при СРК-Д отмечается относительное преобладание парасимпатической активности вегетативного фона за счет снижения тонуса симпатического отдела ВНС. Результаты, подтверждающих гиперсимпатикотонию в группе СРК-З, при использовании этой методики не выявлено.

Таблица 1

Показатели ВКСП у пациентов с различными формами СРК и у здоровых добровольцев

Группы	Латентный период (с)	Амплитуда А1 (мВ)	Амплитуда А2 (мВ)	А1/А2	T (с)
Контроль (n = 22)	1,50 ± 0,04	0,73 ± 0,08	2,71 ± 0,34	0,35 ± 0,05	6,52 ± 0,33
СРК с диареей (n = 29)	1,58 ± 0,04	0,65 ± 0,10	1,43 ± 0,16*#	0,49 ± 0,06*#	6,40 ± 0,33
СРК с запорами (n = 29)	1,41 ± 0,12	0,57 ± 0,08	2,58 ± 0,37	0,32 ± 0,04	7,60 ± 0,58#^

Примечание. # — сравнение группы СРК с запорами и группы СРК с диареей ($p \leq 0,05$); * — сравнение группы СРК с диареей и группы нормы ($p \leq 0,01$); ^ — сравнение группы СРК с запорами и группы нормы ($p \leq 0,05$) (критерий Манна—Уитни)

Среднее значение общего времени реакции (Т) оказалось достоверно больше в группе пациентов СРК-З, чем в группе СРК-Д и в группе здоровых добровольцев. Удлинение периода реакции до 8,5 с и более может свидетельствовать о нарушении качества вегетативного регулирования на уровне центрального звена [20, 21]. В группе СРК-З удлинение общего времени реакции более 8,5 с отмечали у 37% больных. В группе СРК-Д данные изменения встречались у 22% больных. В контрольной группе удлинение периода Т регистрировали в 9% случаев. Полученные данные могут указывать на более выраженные изменения вегетативной сферы у больных СРК-З.

При изучении ВКСР у больных СРК в ряде случаев отмечали отсутствие кожно-гальванической реакции. По данным разных авторов, подобный феномен встречается у здоровых добровольцев лишь в 5% случаев или не встречается вообще [20, 22]. Отсутствие КГР в ответ на стимуляцию может указывать на аperiodическое вырождение вегетативного регулирования [20]. В проведенном исследовании этот феномен встречался только у больных СРК-З и составил 20,6% от общего числа пациентов в группе.

Разделив пациентов с СРК по признаку наличия (ВКСР «+») или отсутствия (ВКСР «-») КГР в ответ на электростимуляцию, был проведен анализ клинических характеристик заболевания: выраженность абдоминального болевого синдрома, нарушения дефекации, уровень тревожных и депрессивных изменений в психическом статусе. Результаты анализа приведены в табл. 2.

У пациентов с отсутствием КГР на электростимуляцию (в группе СРК-З) отмечались более выраженная абдоминалгия (при оценке по визуально-аналоговой шкале и опроснику Мак-Гилла) и изменения в психоэмоциональной сфере в виде тенденции к повышению уровня тревожности (по соответствующему разделу шкалы HADS). В группе пациентов с СРК-Д наблюдали более высокие значения показателей депрессии, по сравнению с группой СРК-З (ВКСР+). Однако наибольший уровень депрессив-

ных изменений был выявлен у пациентов с запорами и отсутствием ВКСР (больных с клинически выраженной тревогой и депрессией по данным шкалы HADS в исследование не включали из-за сложности дифференциации симптомов СРК и психической патологии).

Анализ полученных данных позволяет предположить, что при форме синдрома раздраженного кишечника с преобладанием конституции вегетативные изменения носят более глубокий и выраженный характер, чем при «диарейной» форме заболевания. Таким образом, выявляется связь изменений в вегетативной сфере с клиническими проявлениями заболевания, что согласуется с данными литературы [23].

Результаты, полученные при исследовании ВСР с помощью приборного комплекса САКР, представлены в табл. 3. Все пациенты с СРК демонстрировали адекватные значения систолического и диастолического АД. В группе СРК-ЗЧСС была достоверно повышена. Спектральные и статистические показатели ВСР в обеих группах больных СРК были значительно снижены по сравнению с контрольной группой (табл. 3). Низкие значения TP и SDNN, характеризующие вариабельность ритма сердца в целом, в данном случае могут отражать снижение уровня активности нейрогуморальных регуляторных систем организма [24]. Уменьшался вклад высокочастотной, низкочастотной, и очень низкочастотной составляющих спектра ВСР. При этом показатель симпатовагального баланса LF/HF имел тенденцию к повышению в обеих группах, что согласуется с данными литературы [25, 26]. Этот факт, а также снижение показателя SDNN подтверждали преобладание симпатической активности у пациентов с СРК.

При анализе процентного соотношения спектральных показателей отмечали достоверное преобладание VLF-составляющей в структуре спектра в группе СРК-Д, в отличие от контроля (рис. 2). Следовательно, у пациентов с диареей было выявлено усиление активности высших вегетативных центров и гуморально-метаболических факторов при ослаблении автономного контура вегетативной регуляции. В проти-

Клиническая характеристика пациентов с СРК

Таблица 2

Группы	ВАШ	Болевой опросник Мак-Гилла	Характер стула (по Бристольской шкале)	Оценка по шкале HADS	
				Тревога	Депрессия
СРК-З (ВКСР+) (n = 22)	4,8 ± 0,38	10,8 ± 0,75	2 тип	8,4 ± 0,34	6,8 ± 0,27
СРК-З (ВКСР-) (n = 7)	6,8 ± 0,81 [#]	14,5 ± 1,62 ^{*#}	1 тип	9,5 ± 0,59	8,2 ± 0,54 [*]
СРК-Д (n = 29)	4,5 ± 0,32	10,3 ± 0,96	6 тип	9,2 ± 0,36	8,1 ± 0,32 [^]

Примечание. * — достоверность разницы между группами СРК-З (ВКСР+) и (ВКСР-); [#] — достоверность разницы между группой СРК-З (ВКСР-) и группой СРК-Д; [^] — достоверность разницы между группой СРК-З (ВКСР+) и группой СРК-Д (p ≤ 0,05) (критерий Стьюдента)

воположность нашим данным, в одном исследовании [27] увеличение вклада VLF-диапазона в общий спектр variability было обнаружено у пациентов с констипацией. Различия в результатах могут быть обусловлены высокой изменчивостью вегетативного фона и смешанным характером нарушений у больных СРК, а также различной длительностью регистрации. Наблюдали разнонаправленные тенденции по процентному вкладу показателя LF, отражающего симпатическую активность: увеличение в группе СРК-3 и снижение в группе СРК-Д по сравнению с группой контроля. Показатель парасимпатического звена регуляции HF, выраженный в процентах, имел самые низкие значения в группе СРК-3. Сходные результаты были получены в исследованиях [24].

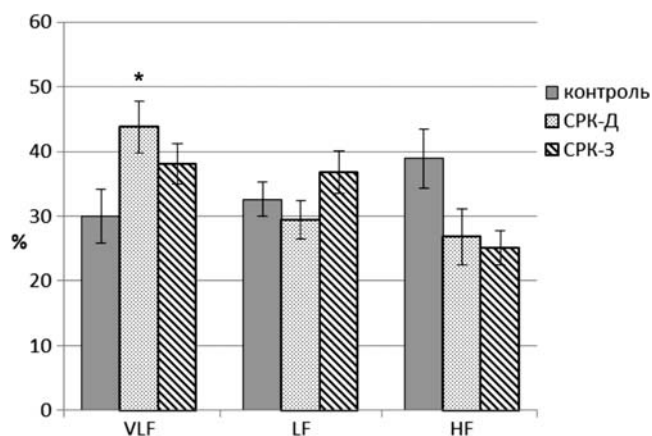


Рис. 2. Процентное соотношение спектральных показателей ВСР. * — сравнение группы СРК с диареей и группы здоровых добровольцев ($p \leq 0,05$), (критерий Манна–Уитни).

Таблица 3

Сравнение показателей ВСР и пДА, полученных с использованием спектрального, временного и геометрического анализа

Группы	Контроль	СРК-Д	СРК-3
Возраст, лет	40,61 ± 2,51	52,53 ± 2,79	38,24 ± 4,51
ИМТ		28,02 ± 1,09	25,34 ± 1,72
САД	126,57 ± 4,88	123,35 ± 5,37	113,54 ± 5,54
ДАД	69,50 ± 4,97	66,68 ± 4,07	57,01 ± 5,36
ЧСС	71,83 ± 1,72	79,91 ± 2,73	89,76 ± 3,30 **
TP	3084,64 ± 474,16	678,26 ± 164,56 *	630,96 ± 156,79*
VLF	791,93 ± 137,23	245,51 ± 42,49*	224,04 ± 54,36 *
LF	1118,61 ± 212,16	240,41 ± 87,20*	220,49 ± 62,63*
HF	1104,22 ± 366,57	166,95 ± 43,04*	177,93 ± 62,86*
LH/HF	1,51 ± 0,28	1,94 ± 0,45	1,97 ± 0,46
TPs	68,87 ± 23,75	59,04 ± 25,16	53,53 ± 10,89
VLFs	36,87 ± 13,91	36,12 ± 19,10	24,78 ± 7,67
LFs	21,22 ± 9,74	13,42 ± 5,53	16,04 ± 3,27 #
HFs	9,57 ± 2,02	7,18 ± 1,59	11,11 ± 1,93 #
LH/HFs	2,38 ± 0,47	1,83 ± 0,36	1,82 ± 0,42
TPd	17,83 ± 4,22	16,70 ± 8,72 *	27,64 ± 7,56 #
VLFd	9,68 ± 3,18	10,95 ± 6,19	15,91 ± 5,23
LFd	6,02 ± 1,53	4,09 ± 1,67 *	8,93 ± 2,28 #
HFd	1,78 ± 0,53	2,02 ± 0,98	2,57 ± 0,58 #
LH/HFd	4,91 ± 0,72	4,29 ± 0,68	4,22 ± 1,00
K _{дых}	1,53 ± 0,04	1,33 ± 0,03 *	1,45 ± 0,05 #
BR	13,74 ± 0,83	9,39 ± 1,52 *	7,68 ± 1,20 *
IVR	20,78 ± 2,63	148,18 ± 33,46 *	160,43 ± 49,17 *
PAPR	5,22 ± 0,37	15,40 ± 2,09 *	18,40 ± 3,16 *
VPR	5,41 ± 0,37	14,75 ± 1,95 *	16,81 ± 2,61 *
IN	125,11 ± 15,51	1026,90 ± 241,78*	1298,58 ± 427,81 *
SDNN	51,20 ± 3,89	21,64 ± 2,82 *	20,00 ± 2,56 *
RMSSD	32,23 ± 2,46	14,70 ± 2,78 *	16,89 ± 3,60 *
pNN50%	7,43 ± 0,29	6,45 ± 0,20 *	6,14 ± 0,44 *

Примечание. * — сравнение групп больных СРК и здоровых добровольцев, $p < 0,05$; # — сравнение групп СРК-Д и СРК-3, $p < 0,05$ (критерий Манна–Уитни)

Активность парасимпатического звена вегетативной регуляции оценивали по показателям RMSSD и ρ NN50 (%). Хотя их значения достоверно не отличались в различных группах пациентов, RMSSD и ρ NN50% при СРК были значительно ниже, чем в группе здоровых добровольцев. Аналогичное снижение показателя ρ NN50% при СРК с запорами и диареей [28] расценивается авторами как снижение парасимпатической активности и преобладание симпатической составляющей вегетативного тонуса.

Существенное повышение значений геометрических показателей ВСР, особенно ИН (стресс-индекса) в группе СРК-3, может быть проявлением повышения активности симпатического отдела ВНС. Этот факт свидетельствует о значительном напряжении регуляторных механизмов при СРК. По данным Е.Ю. Майчук с соавторами [29], вегетативные нарушения у пациентов с СРК были более выраженными и стойкими, чем у пациентов с органической патологией кишечника.

При проведении кардиоваскулярного теста с медленным дыханием было обнаружено снижение $K_{\text{дых}}$ у больных СРК по сравнению с контролем, в основном за счет более выраженного эффекта у пациентов с СРК-Д. Недостаточная компенсаторная парасимпатическая активация может быть предпосылкой для нарушения симпатико-парасимпатического баланса и срыва вегетативного контроля. По результатам этой пробы было также выявлено снижение BR у больных СРК, что выявляет ослабление тонуса блуждающего нерва вследствие возможного нарушения вегетативных механизмов на бульбарном уровне [30].

Спектральные показатели variability пАД выявили существенное увеличение низкочастотных составляющих спектров variability систолического (LFs) и диастолического давления (LFd) в группе СРК-3 в сравнении с СРК-Д, что подтверждает преобладание симпатических влияний в регуляции этих параметров у пациентов с констипацией. Незначительно повышенные значения высокочастотных (HF) составляющих variability пАД в этой же группе могут отражать опосредованное влияние на variability пАД дыхательной парасимпатической активности. Увеличение общей мощности variability диастолического пАД (TPd) у пациентов с СРК-3, в отличие от СРК-Д, имеющих противоположную направленность изменений этого показателя и показателя LFd, может быть обусловлено изменением характера регуляции периферического сосудистого тонуса.

Таким образом, в настоящем исследовании у всех больных с синдромом раздраженного кишечника обнаружены изменения в вегетативной сфере с преобла-

данием симпатикотонии, более выраженной в группе СРК-3.

Значения спектральных и статистических показателей ВСР у пациентов СРК были достоверно ниже по сравнению со значениями здоровых испытуемых, что свидетельствует о нарушении общего уровня вегетативного регулирования. Отмечали повышение показателей симпато-вагального баланса. Кроме того, обнаружено повышение мощности очень низкочастотной компоненты ВСР, отражающей активность надсегментарных вегетативных центров, гуморальных и эндотелиальных факторов, у пациентов с СРК-Д. Смещение вегетативного баланса в сторону симпатикотонии у пациентов с СРК подтвердили и геометрические показатели variability, это изменение было более выражено в группе СРК-3. По показателям variability пАД обнаружено относительное усиление симпатической активности в этой же группе.

При проведении пробы с медленным дыханием у всех пациентов СРК было отмечено снижение уровня барорефлекторной чувствительности и коэффициента дыхательной аритмии в группе СРК-Д.

Выявлена взаимосвязь между тяжестью клинических проявлений заболевания и изменениями со стороны вегетативной сферы, что может быть использовано в клинической практике как один из компонентов оценки эффективности проводимой терапии.

Список литературы

1. Самсонов А.А., Плотникова Е.Ю., Андреев Н.Г., Краснова М.В., Баранова Е.Н. Синдром раздраженного кишечника — болезнь со многими неизвестными, некоторые терапевтические аспекты. *Лечащий Врач*. 2012; 2: 34—8.
2. Симаненков В.И., Лутаенко Е.А. *Лечение синдрома раздраженного кишечника с позиций доказательной медицины. Пособие для врачей и клинических фармакологов*. СПб., 2008.
3. Quigley E.M., Abdel-Hamid H., Barbara G., Bhatta S.J., Boeckxstaens G., De Giorgio R. et al. A global perspective on irritable bowel syndrome: a consensus statement of the World Gastroenterology Organization Summit Task Force on irritable bowel syndrome. *J. Clin. Gastroenterol.* 2012; 46(5): 356—366.
4. Pata C., Erdal E., Yazc K. et al. Association of the -1438 G/A and 102 T/G polymorphism of the 5-Ht2A receptor gene with irritable bowel syndrome 5-Ht2A gene polymorphism in irritable bowel syndrome. *J. Clin. Gastroenterol.* 2004; 38: 561—566.
5. Jones M.P., Dille J.B., Drossman D.A., Crowell M.D. Brain-gut connections in functional GI disorders: anatomic and physiologic relationships. *Neurogastroent. Motil.* 2006; 18: 91—103.
6. Lydiard R.B. Increased prevalence of functional gastrointestinal disorders in panic disorder: clinical and theoretical implications. *CNS Spectr.* 2005; 10 (11): 899—908.
7. Крыжановский Г.Н. *Общая патофизиология нервной системы. Руководство*. М., Медицина, 1997.

8. Magdy El-Salhy. Irritable bowel syndrome: Diagnosis and pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* 2012; 18(37): 5151—5163.

9. Парфенов А.И. *Энтерология*. М., Триада-Х; 2002.

10. Воробьева О.В. Вегетативные дисфункции, ассоциированные с тревожными расстройствами. *Эффективная фармакотерапия*. 2011; 1: 46—50.

11. Melzak R. The McGill Pain Questionnaire: Major properties and scoring methods. *Pain*. 1975; 1: 277—299.

12. Вейн А.М. *Вегетативные расстройства. Клиника, диагностика, лечение*. М., Медицина; 1998.

13. Elie B., Guihereuc P. Sympathetic skin response: normal results in different experimental conditions. *Electroencephal. Clin. Neurophysiol.*, 1990; 76: 258—267.

14. Пивоваров В.В. *Спироартериокардиограмма*. СПб., Медицинская техника; 2006.

15. Панкова Н.Б., Лебедева М.А., Курнешова Л.Е. и др. Спироартериокардиография — новый метод изучения состояния сердечно-сосудистой системы. *Патогенез*. 2003; 1(2): 84—8.

16. Heart rate variability. Standard of measurement, physiological, and clinical use. Task Force of European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Europ. Heart J.* 1996; 17: 354—381.

17. Баевский Р.М., Иванов Г.Г. *Вариабельность сердечного ритма: теоретические аспекты и возможности клинического применения*. М., Медицина; 2000.

18. Tousignant-Laflamme Y., Goffaux P., Bourgault P. et al. Different autonomic responses to experimental pain in IBS patients and healthy controls. *J. Clin. Gastroenterol.* 2006; 40(9): 814—820.

19. Labus J.S., Hubbard C.S., Bueller J. et al. Impaired emotional learning and involvement of the Cortico-Release factor signal system in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterol.* 2013; 145(6): 1253—1261.

20. Гнездицкий В.В., Корепина О.С. *Атлас по выделенным потенциалам мозга*. Иваново. ПресСто; 2011.

21. Одинак М.М., Шустов Е.Б., Коломенцев С.В. Методология инструментального изучения вегетативной нервной системы в норме и патологии. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2012; 2(38): 145—152.

22. Kucera P., Goldenberg Z., Kurca E. Skin sympathetic response: review of the methods and its clinical use. *Bratisl. Lek. Listy*. 2004; 105(3): 108—116.

23. Бикбулатова Е.А., Осипенко М.Ф., Холин С.И. Вегетативная дисфункция и клинические проявления у больных с синдромом раздраженного кишечника. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2004; 1: 95.

24. Кульчицкая Е.Н., Станиславчук Н.А. Вегетативный дисбаланс у больных с синдромом раздраженного кишечника. *Сучасна гастроентерологія*. 2013; 6(74): 43—47.

25. Tillisch K., Mayer E.A., Labus J.S., Stains J., Chang L., Naliboff B.D. Sex specific alterations in autonomic function among patients with irritable bowel syndrome. *Gut*. 2005; 54(10): 1396—1401.

26. Heitkemper M., Jarrett M., Kein K.C., Burr R., Levy R.L., Feld A., Hertig V. Autonomic Nervous System Function in Women with Irritable Bowel Syndrome. *Digestive Diseases and Sciences*. 2001; 46 (6): 1276—1284.

27. Adeyemi E.O.A., Desai K.D., Towsey M., Ghista D. Characterization of autonomic dysfunction in patients with

irritable bowel syndrome by means of heart rate variability studies. *Amer. J. Gastroenterol.* 1999; 94(3): 816—823.

28. Nayem M., Begum N., Ferdousi S. Time domain measures of heart rate variability to assess autonomic dysfunction in irritable bowel syndrome. *J. Bangladesh Soc. Physiol.* 2012; 7(2): 60—65.

29. Майчук Е.Ю., Макарова И.А., Новожилов Д.Г. Сравнительные особенности психоэмоционального и вегетативного статуса у пациентов с синдромом раздраженного кишечника и неспецифическим язвенным колитом. *Профилактическая и клиническая медицина*, СПб. Спец. Выпуск, 2010; 170—174.

30. Цырлин В.А., Хрусталева Р.С. Роль адренергических механизмов мозгового ствола и спинного мозга в центральной регуляции кровообращения. *Вестник аритмологии*. 2001; 22: 75—80.

References

1. Samsonov A.A., Plotnikova E.Ju., Andreev N.G., Krasnova M.V., Baranova E.N. Irritable Bowel Syndrome — a disease with many unknowns, some therapeutic aspects. *Lechashnij Vrach*. 2012; 2: 34—8 (In Russian).

2. Simanenkov V.I., Lutaenko E.A. *Treatment of irritable bowel syndrome with evidence-based medicine products. Manual for physicians and clinical pharmacists*. SPb.; 2008 (In Russian).

3. Quigley E.M., Abdel-Hamid H., Barbara G., Bhatta S.J., Boeckxstaens G., DeGiorgio R. et al. A global perspective on irritable bowel syndrome: a consensus statement of the World Gastroenterology Organization Summit Task Force on irritable bowel syndrome. *J. Clin. Gastroenterol.* 2012; 46(5): 356—366.

4. Pata C., Erdal E., Yazc K. et al. Association of the -1438 G/A and 102 T/G polymorphism of the 5-Ht2A receptor gene with irritable bowel syndrome 5-Ht2A gene polymorphism in irritable bowel syndrome. *J. Clin. Gastroenterol.* 2004; 38: 561—566.

5. Jones M.P., Dille J.B., Drossman D.A., Crowell M.D. Brain-gut connections in functional GI disorders: anatomic and physiologic relationships. *Neurogastroent. Motil.* 2006; 18: 91—103.

6. Lydiard R.B. Increased prevalence of functional gastrointestinal disorders in panic disorder: clinical and theoretical implications. *CNS Spectr.* 2005; 10 (11): 899—908.

7. Kryzhanovskij G.N. *General pathophysiology of the nervous system. Guide*. М., Medicina; 1997 (In Russian).

8. Magdy El-Salhy. Irritable bowel syndrome: Diagnosis and pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* 2012; 18(37): 5151—5163.

9. Parfenov A.I. *Enterology*. М.: Triada-H; 2002 (In Russian).

10. Vorob'eva O.V. Autonomic dysfunction associated with anxiety disorders. *Jeftektivnaja farmakoterapija*. 2011; 1: 46—50 (In Russian).

11. Melzak R. The McGill Pain Questionnaire: Major properties and scoring methods. *Pain*. 1975; 1: 277—299.

12. Vejn A.M. *Autonomic dysfunction. The clinic, diagnosis, treatment*. М., Medicina; 1998 (In Russian).

13. Elie B., Guihereuc P. Sympathetic skin response: normal results in different experimental conditions. *Electroencephal. Clin. Neurophysiol.*, 1990; 76: 258—267.

14. Pivovarov V.V. *Spiroarteriovenouscardiorhythmography*. SPb., Medicinskaja tehnika; 2006 (In Russian).

15. Pankova N.B., Lebedeva M.A., Kurneshova L.E. i dr. Spiroarteriovenousrhythmography — a new method of studying the state of the cardiovascular system. *Patogenez*. 2003; 1(2): 84—8 (In Russian).
16. Heart rate variability. Standart of measurement, physiological, and clinical use. Task Force of European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Europ. Heart J.* 1996; 17: 354—381.
17. Baevskij R.M., Ivanov G.G. *Heart rate variability: theoretical aspects and clinical applications*. M., Medicina; 2000 (In Russian).
18. Tousignant-Laflamme Y., Goffaux P., Bourgault P. et al. Different autonomic responses to experimental pain in IBS patients and healthy controls. *J. Clin. Gastroenterol.* 2006; 40(9): 814—820.
19. Labus J.S., Hubbard C.S., Bueller J. et al. Impaired emotional learning and involvement of the Cortico-Releasing factor signal system in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterol.* 2013; 145(6): 1253—1261.
20. Gnezdickij V.V., Korepina O.S. *Atlas of the brain evoked potentials*. Ivanovo. PresSto; 2011 (In Russian).
21. Odinak M.M., Shustov E.B., Kolomencev S.V. Methodology instrumental study of the autonomic nervous system in health and disease. *Vestnik Rossijskoj voenno-medicinskoj akademii*. 2012; 2(38): 145—152 (In Russian).
22. Kucera P., Goldenberg Z., Kurca E. Skin sympathetic response: review of the methods and its clinical use. *Bratisl. Lek. Listy*. 2004; 105(3): 108—116.
23. Bikbulatova E.A., Osipenko M.F., Holin S.I. Autonomic dysfunction and clinical manifestations in patients with irritable bowel syndrome. *Jeksperimental'naja i klinicheskaja gastrojenterologija*. 2004; 1: 95 (In Russian).
24. Kul'chickaja E.N., Stanislavchuk N.A. Autonomic imbalance in patients with irritable bowel syndrome. *Suchasna Gastroenterologija*. 2013; 6(74): 43—47 (In Russian).
25. Tillisch K., Mayer E.A., Labus J.S., Stains J., Chang L., Naliboff B.D. Sex specific alterations in autonomic function among patients with irritable bowel syndrome. *Gut*. 2005; 54(10): 1396—1401.
26. Heitkemper M., Jarrett M., Kein K.C., Burr R., Levy R.L., Feld A., Hertig V. Autonomic Nervous System Function in Women with Irritable Bowel Syndrome. *Digestive Diseases and Sciences*. 2001; 46 (6): 1276—1284.
27. Adeyemi E.O.A., Desai K.D., Towsey M., Ghista D. Characterization of autonomic dysfunction in patients with irritable bowel syndrome by means of heart rate variability studies. *Amer. J. Gastroenterol.* 1999; 94(3): 816—823.
28. Nayem M., Begum N., Ferdousi S. Time domain measures of heart rate variability to assess autonomic dysfunction in irritable bowel syndrome. *J. Bangladesh Soc. Physiol.* 2012; 7(2): 60—65.
29. Majchuk E.Ju., Makarova I.A., Novozhilov D.G. Comparative characteristics of psycho-emotional and vegetative status of patients with irritable bowel syndrome and ulcerative colitis. *Profilakticheskaja i klinicheskaja medicina*, SPb. — spec. vypusk; 2010; 170—174 (In Russian).
30. Cyrilin V.A., Hrustaleva R.S. The role of adrenergic mechanisms of the brain stem and spinal cord in the central regulation of blood circulation. *Vestnik aritmologii*. 2001; 22: 75—80 (In Russian).

Поступила 26.06.14
Received 26.06.14

Сведения об авторах:

Карганов Михаил Юрьевич (Karganov M.Yu.) — д.б.н., профессор, руководитель лаборатории полисистемных исследований, ФГБУ «НИИ ОПП» РАМН

Козлова Юлия Александровна (Kozlova Y.A.) — врач-гастроэнтеролог, ГБУЗ НПЦ психоневрологии ДЗМ
Готовцева Галина Николаевна (Gotovtceva G.N.) — к.м.н., врач отделения функциональной диагностики, ГБУЗ НПЦ психоневрологии ДЗМ

Тумуров Дмитрий Александрович (Tumurov D.A.) — научный сотрудник ГБУЗ НПЦ психоневрологии ДЗМ
Гудкова Анна Алексеевна (Gudkova A.A.) — зам. директора по лечебной работе, ГБУЗ НПЦ психоневрологии ДЗМ

Гехт Алла Борисовна (Gueht A.B.) — д.м.н., профессор, директор ГБУЗ НПЦ психоневрологии ДЗМ

Свешников Д.С.¹, Торшин В.И.¹, Смирнов В.М.², Кучук А.В.¹, Мясников И.Л.¹

Значение различных серотонинорецепторов в регуляции моторики желудочно-кишечного тракта

¹ — Кафедра нормальной физиологии медицинского факультета Российского университета дружбы народов, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8

² — Кафедра нормальной физиологии Российского национального исследовательского медицинского университета, 117995, Москва, ул. Островитянова, 1

Серотонинергические механизмы участвуют во многих пищеварительных функциях ЖКТ. Особую роль серотонинреактивные структуры играют в нервной регуляции моторной активности. Изучение данных структур представляет особый интерес в связи с широкой распространенностью синдрома раздраженного кишечника, охватывающего до 20% взрослого населения, что делает исследования в указанной области актуальными и востребованными. Выполнено 6 серий острых экспериментов на 102 крысах Вистар. Опыты проводили в условиях хирургического наркоза (нембутал, 60 мг/кг) и ИВЛ. Регистрировали двигательные реакции желудка, двенадцатиперстной и восходящей ободочной кишки на внутриартериальное введение серотонина адипината (1 мг/кг) в условиях совместной блокады симпатического и парасимпатического звеньев ВНС, а также на фоне блокады различных типов 5-НТ-рецепторов. Введение 5-НТ-блокаторов снижало выраженность двигательных ответов желудка, двенадцатиперстной и толстой кишки в различной степени. На основании полученных данных сделано заключение, что 5-НТ_{1Б}-рецепторы, в основном, расположены в нейронах ЭНС. Распределение же 5-НТ_{2Б,4}-рецепторов гетерогенно: 5-НТ_{2Б}-рецепторы расположены на энтеральных нейронах стенки желудка и на миоцитах кишечника. 5-НТ₃-рецепторы локализируются в ганглиях, снабжающих желудок и толстую кишку, а 5-НТ₄-рецепторы преимущественно располагаются на гладких мышцах желудка и энтеральных нейронах двенадцатиперстной и восходящей ободочной кишки.

Ключевые слова: 5-НТ-рецепторы, желудочно-кишечный тракт, моторика, регуляция

Sveshnikov D.S.¹, Torshin V.I.¹, Smirnov V.M.², Kuchuk A.V.¹, Myasnikov I.L.¹

The significance of different 5-HT-receptors in regulation of gastrointestinal motility

¹ — People's Friendship University of Russia, dept of normal physiology, 117198, Moscow, Mikluho-Maklaya st., 8

² — Russian State Medical University, dept of normal physiology, 117995, Москва, Ostrovityanova st., 1

Serotonergic mechanisms are involved in many, if not all digestive functions of the gastrointestinal tract. A special role is played by serotonergic structures in the neuronal control of motor activity. The study of these structures is of particular interest due to the widespread occurrence of irritable bowel syndrome, covering up to 20% of the adult population, which makes the research in this area up to date and in demand. Acute experiments were performed on 102 Wistar rats in 6 series. Experiments were carried out under general anesthesia (Nembutal, 60 mg/kg) and mechanical lung ventilation. Motor responses of the stomach, duodenum and ascending colon were studied to i.a. Serotonin adipate infusion (1 mg/kg) during joint blockade of sympathetic and parasympathetic chains of ANS, as well as on the background of the blockade of various 5-HT-receptors. Infusions of 5-HT-blockers reduce the magnitude of motor responses in stomach, duodenum and colon in varying degrees. Based on these data found 5-HT_{1B}-receptors are mainly located in enteric neurons. The distribution of 5-HT_{2B,4}-receptor is heterogeneous: 5-HT_{2B}-receptors are located in enteric neurons of the stomach and intestinal myocytes; 5-HT₃-receptors localized in the ganglia supplying the stomach and colon and 5-HT₄-receptors are mainly located in the smooth muscle of the stomach, duodenal and ascendent colon enteric neurons.

Key words: 5-HT-receptors, the gastrointestinal tract, motility, regulation

Роль серотонинергических механизмов в регуляции моторики желудочно-кишечного тракта в последнее десятилетие активно обсуждается физиологами,

клиницистами, патофизиологами и другими специалистами [9, 10, 15]. Основные запасы серотонина в организме (до 95%), как показали последние исследования [8], находятся в кишечной стенке. Несмотря на широкую распространенность серотонинреактивных структур, обилие 5-НТ-рецепторов в составе слизистой оболочки, а также наличие серотонинергических

Для корреспонденции: Свешников Дмитрий Сергеевич, д.м.н., доцент, Российский университет дружбы народов, кафедра нормальной физиологии медицинского факультета, e-mail: dmsveshnikov@gmail.com

нейронов в миэнтеральном и подслизистом нервных сплетениях [8, 9, 10, 15], все, что касается термина «серотонин», в большей степени ассоциируется с функционированием ЦНС и высшей нервной деятельности. Незаслуженно забыт и тот факт, что эра серотонина началась именно с работ, посвященных деятельности ЖКТ [5, 7]. В последующем, в работах Bulbring было впервые показано, что перистальтический рефлекс осуществляется с помощью серотонина [5]. В 60-х годах прошлого века значительный вклад в изучение серотонинреактивных структур внес американский гистолог М. Gershon, впервые идентифицировавший и описавший энтеральные серотонинергические нейроны. В 90-х годах В.М. Смирнов с соавторами впервые выдвинули гипотезу о наличии экстраорганных серотонинергических нервов, усиливающих моторику желудка и кишечника и получили ее подтверждение в последующих работах [1—3].

Интерес к проблеме серотонинергической иннервации органов ЖКТ возродился в последнее десятилетие в связи с широким распространением синдрома раздраженного кишечника, который можно считать одной из «болезней цивилизации»: по данным Minosha [12], данная патология распространена у 20% взрослого населения. Способы медикаментозной коррекции различных форм этого синдрома, включавшие холино- и ганглиоблокаторы, в большинстве случаев оказывались малоэффективными, однако после введения в схемы лечения блокаторов и агонистов 5-НТ рецепторов ситуация значительно улучшилась. В частности, показано [6], что применение блокатора 5-НТ₃-рецепторов аллосетрона эффективно при синдроме раздраженного кишечника с преобладанием диареи, а при форме с развитием запоров — тегазерода — агониста 5-НТ₄-рецепторов. Авторы подчеркивают, что к другим формам лечения, больные данных групп были резистентны, симптомы устранились лишь после использования препаратов, влияющих на серотонинреактивные структуры. Блокаторы 5-НТ₃-рецепторов, как полагают авторы [13], препятствуют реализации рефлекса со слизистой оболочки, в который вовлечены энтерохромаффинные клетки, чувствительные нейроны подслизистого слоя и серотонинергические нейроны миэнтерального нервного сплетения. Агонисты 5-НТ₄-рецепторов обладают прокинетиическими свойствами, они вызывают перистальтический рефлекс, усиливают моторику и снижают болевые ощущения [10].

Отметим, что, несмотря на значительный прогресс в данной области, механизмы осуществления перечисленных рефлексов выяснены не до конца и порой противоречивы. Так, например, до сих пор нет ясности в вопросе о роли энтерохромаффинных клеток в осуществлении перистальтики: по мнению одних ав-

торов [11], перистальтический рефлекс способен возникнуть и без их помощи, однако другие исследователи [14] полагают, что без энтерохромаффинных клеток рефлексорные сокращения невозможны. Отсутствие общей концепции нервной регуляции моторики, а также ограниченные возможности использования препаратов-агонистов и блокаторов 5-НТ-рецепторов в клинике в связи с рядом выраженных побочных свойств [14], действием на системную гемодинамику [4] затрудняют проведение дальнейших исследований, но вместе с тем побуждают искать новые подходы к решению поставленных задач. Таким образом, что дальнейшее изучение нервной регуляции моторики является перспективным и востребованным направлением.

Цель исследования — определение локализации и функциональной роли 5-НТ-рецепторов в различных структурах пищеварительного канала.

Методика

Выполнены 6 серий опытов на 102 крысах Вистар, массой 250—450 г. Кормление животных прекращали за 12 ч до эксперимента. Опыт проводили в соответствии с этическими правилами, животных вводили во II стадию наркоза (нембутал 60 мг/кг в/м), препаровка и эксперимент осуществлялись в условиях ИВЛ. В ходе препаровки пересекали блуждающие и языкоглоточные нервы. Введение растворов серотонина и блокаторов 5-НТ-рецепторов во время опыта осуществляли в течение 30 с через катетризованный центральный отрезок левой общей сонной артерии, обеспечивая доставку препарата практически в область дуги аорты. Такой достаточно сложный способ введения серотонина был выбран не случайно, поскольку внутриартериальная инъекция исключает быструю инактивацию серотонина тканью легкого и позволяет избежать нарушений гемодинамики со стороны малого круга [2, 4].

После лапаротомии в желудок, двенадцатиперстную, восходящую ободочную кишку через разрез вводили миниатюрные катетеры с эластичными баллончиками на конце. Катетеры укрепляли кисетным швом и заполняли 0,15 мл дистиллированной воды, нагретой до 37°C.

Баллончики для регистрации внутриполостного давления подсоединяли к датчикам давления Honeywell (США), сигналы от них поступали на АЦП Macclab 8e (Австралия), соединенного с компьютером, запись велась с помощью программы Chart 4. Регистрацию начинали не ранее, чем через 30 мин после ушивания лапаротомной раны. Скорость оцифровки для каждого канала составляла 1000 точек/с.

Дальнейший ход опытов у всех животных предусматривал совместное введение адreno- и холиноблокаторов, поскольку ранее нами было установлено, что блокада адренергического и холинергического звеньев ВНС способствовала развитию реакций на серотонин [2, 3]. По истечении 10 мин на фоне продолжающегося действия адreno- и холиноблокаторов животным вводили серотонин, а по окончании развившихся реакций — блокатор 5HT-рецепторов (табл. 1), заканчивая опыт введением серотонина в той же дозе.

Планируя проведение экспериментов, мы опирались на фундаментальные источники [8, 10, 15, 16] в которых показано наличие множества различных 5-HT-рецепторов в энтеральных нейронах, на гладких мышцах, а также на интерстициальных клетках Кахаля. Без сомнения, все эти данные представляют огромную ценность, однако установить функциональную роль 5-HT-рецепторов в норме и при ряде патологических состояний невозможно без четкого понимания о преимущественной локализации данных рецепторов в различных структурах пищеварительного канала, что и явилось основной задачей нашей работы.

Обсчет полученных данных учитывал усредненные значения показателей внутриполостного давления, а также амплитуды медленных электрических волн. Статистическую обработку проводили, используя модель «до и после воздействия», для чего осуществляли сравнение отдельных реакций, вызванных введением различных препаратов с фоновыми показателями за равные промежутки времени. После проверки распределения на нормальность, определяли различия с помощью парного теста Стьюдента для зависимых выборок. Критическое значение уровня значимости принималось равным 5% ($p < 0,05$). Для анализа использовали программу StatPlus.

Результаты и обсуждение

Для выполнения основной задачи исследования — установления преимущественной локализации серотонинорецепторов использовали следующий алгоритм: если используемый блокатор устранял или резко снижал выраженность реакций на серотонин (рисунок), то предполагалось, что заблокированные рецепторы преимущественно находятся на эффекторных образованиях — гладких мышцах, либо структурах иной природы, исключая адренергические или холинергические нейроны, поскольку все поставленные нами опыты проведены в условиях ваготомии и блокады адренергического и холинергического звеньев вегетативной нервной системы. Сохранение же ответов на серотонин может свидетельствовать о том, что блокада коснулась лишь энтеральных нейронов, а эффекторы при этом не затрагиваются. Подчеркнем, что подобный доказательный подход используется при проведении клинических исследований.

Результаты проведенных экспериментов (табл. 2—5) показали, что миансерин полностью блокировал реакции на экзогенный серотонин во всех изучаемых отделах желудочно-кишечного тракта, о чем свидетельствуют отсутствие прироста внутриполостного давления на желудке и двенадцатиперстной кишке, выраженность же оставшихся стимуляторных реакций на восходящей ободочной кишке была незначительной, но тем не менее использование даже такого неселективного блокатора, как миансерин (табл. 1) позволило поставить под сомнение предположение Wouters с соавторами [15] о роли 5-HT₄-рецепторов в расслаблении толстой кишки. Поскольку миансерин этих рецепторов не блокирует, стимуляторные реакции могли развиваться в результате стимуляции данных структур серотонином.

Таблица 1

Фармакологические препараты, использованные в эксперименте, дозы и способ введения

Название препарата	Доза	Способ введения
Серотонина адипинат	0,1 мг/кг	в/а
Бускопан — М-холиноблокатор	1 мг/кг	п/к
Пентамин — N-холиноблокатор	1 мг/кг	п/к
Пропранолол — β-адrenoблокатор	1 мг/кг	п/к
Доксазозин — α-адrenoблокатор	1 мг/кг	п/к
Миансерин — блокатор 5-HT _{1D} , 5HT _{2A} , 5-HT _{2C} , 5-HT ₃ , 5-HT ₆ , 5-HT ₇ -рецепторов и α-адренорецепторов	1 мг/кг	в/а
NAS-181 — блокатор 5-HT _{1b} -рецепторов	0,1 мг/кг	в/а
SB 204741 — блокатор 5-HT _{2b} -рецепторов	0,05 мг/кг	в/а
MDL 72222 — блокатор 5-HT ₃ -рецепторов	1 мг/кг	в/а
RS 39604 — блокатор 5HT ₄ -рецепторов	0,1 мг/кг	в/а

Примечание. в/а — внутриаартериально; п/к — подкожно

Реакции желудка на введение серотонина (0,1 мг/кг)
на фоне действия блокаторов серотонинорецепторов различных типов ($M \pm m$)

Название препарата	Моторика на фоне продолжающегося действия адрено- и холиноблокаторов	Реакция на серотонин на фоне продолжающегося действия адрено- и холиноблокаторов	Фон до введения блокаторов (мм рт.ст.)	Результат на введение блокаторов (мм рт.ст.)	Фон до введения серотонина (мм рт.ст.)	Результат на введение серотонина (мм рт.ст.)
Миансерин — блокатор 5HT _{1D,2A,2C,3,6,7} -рецепторов	13,56 ± 2,32	21,1 ± 2,11	13,01 ± 2,34	12,48 ± 2,53	12,48 ± 2,53	12,51 ± 2,4
NAS-181 — блокатор 5-HT _{1b} -рецепторов	12,1 ± 1,63	18,56 ± 2,34	12,08 ± 2,12	12,1 ± 1,95	12,1 ± 1,95	17,32 ± 1,17
SB 204741 — блокатор 5-HT _{2b} -рецепторов (0,05 мг/кг)	12,35 ± 1,39	15,52 ± 1,64	12,13 ± 1,52	12,13 ± 1,18	12,09 ± 1,51	14,23 ± 1,08
MDL 72222 — блокатор 5HT ₃ -рецепторов	13,58 ± 2,24	17,68 ± 2,29	13,9 ± 2,33	13,82 ± 2,29	13,82 ± 2,29	17,9 ± 2,28
RS 39604 — блокатор 5HT ₄ -рецепторов	13,6 ± 1,93	17,11 ± 1,82	13,95 ± 2,55	17,35 ± 2,48	12,81 ± 2,12	12,9 ± 2,19

Реакции двенадцатиперстной кишки на введение серотонина (0,1 мг/кг)
на фоне действия блокаторов серотонинорецепторов различных типов ($M \pm m$)

Название препарата	Моторика на фоне продолжающегося действия адрено- и холиноблокаторов	Реакция на серотонин на фоне продолжающегося действия адрено- и холиноблокаторов	Фон до введения блокаторов (мм рт.ст.)	Результат на введение блокаторов (мм рт.ст.)	Фон до введения серотонина (мм рт.ст.)	Результат на введение серотонина (мм рт.ст.)
Миансерин — блокатор 5HT _{1D,2A,2C,3,6,7} -рецепторов	8,03 ± 1,09	19,25 ± 3,24	8,16 ± 1,25	8,11 ± 1,68	8,16 ± 1,25	8,21 ± 2,08
NAS-181 — блокатор 5-HT _{1b} -рецепторов	9,23 ± 1,15	19,62 ± 1,14	8,12 ± 1,43	8,14 ± 1,35	8,12 ± 1,5	17,35 ± 1,14
SB 204741 — блокатор 5-HT _{2b} -рецепторов (0,05 мг/кг)	8,28 ± 1,51	17,41 ± 2,18	8,04 ± 1,35	8,07 ± 2,11	8,05 ± 1,21	8,3 ± 2,91
MDL 72222 — блокатор 5HT ₃ -рецепторов	7,16 ± 4,04	19,2 ± 1,23	8,03 ± 1,07	8,03 ± 1,43	8,03 ± 1,47	12,5 ± 1,17
RS 39604 — блокатор 5HT ₄ -рецепторов	9,67 ± 1,12	17,24 ± 3,11	8,14 ± 1,04	11,21 ± 0,93	8,19 ± 0,52	11,09 ± 0,43

Реакции восходящей ободочной кишки на введение серотонина (0,1 мг/кг)
на фоне действия блокаторов серотонинорецепторов различных типов ($M \pm m$)

Название препарата	Моторика на фоне продолжающегося действия адрено- и холиноблокаторов	Реакция на серотонин на фоне продолжающегося действия адрено- и холиноблокаторов	Фон до введения блокаторов (мм рт.ст.)	Результат на введение блокаторов (мм рт.ст.)	Фон до введения серотонина (мм рт.ст.)	Результат на введение серотонина (мм рт.ст.)
Миансерин — блокатор 5HT _{1D,2A,2C,3,6,7} -рецепторов	7,08 ± 0,46	45,87 ± 4,13	7,16 ± 0,9	7,22 ± 1,12	7,22 ± 1,12	7,16 ± 1,06
NAS-181 — блокатор 5-HT _{1b} -рецепторов	8,11 ± 1,25	45,12 ± 2,03	8,11 ± 0,13	8,06 ± 0,25	8,06 ± 0,17	43,12 ± 1,78
SB 204741 — блокатор 5-HT _{2b} -рецепторов (0,05 мг/кг)	7,13 ± 2,44	36,12 ± 1,34	8,35 ± 0,5	8,21 ± 0,12	8,35 ± 0,11	8,39 ± 0,2
MDL 72222 — блокатор 5HT ₃ -рецепторов	9,04 ± 1,47	39,9 ± 3,24	7,12 ± 0,14	7,13 ± 1,32	7,56 ± 0,34	28,21 ± 1,05
RS 39604 — блокатор 5HT ₄ -рецепторов	8,68 ± 2,45	37,49 ± 3,15	7,22 ± 0,9	7,03 ± 0,52	7,03 ± 0,52	11,03 ± 3,11

Изменения прироста внутриполостного давления на серотонин в различных условиях.
(Данные представлены в процентах. За 100% принимается исходный уровень гидростатического давления до введения серотонина)

Наименование блокатора	Желудок		Двенадцатиперстная кишка		Восходящая ободочная кишка	
	1	2	1	2	1	2
Миансерин	175	0	237	0	643	157
NAS-181	150	141	212	211	562	537
SB-204741	125	117	212	0	514	0
MDL-72222	131	131	271	150	439	400
RS-39604	131	0	189	137	462	157

Применение NAS-181 — блокатора 5-НТ_{1b}-рецепторов незначительно снижало выраженность стимуляторных реакций на желудке и толстой кишке, соответственно на 6 и 25%, на двенадцатиперстной же кишке изменения не носили значимого характера, что не исключает вывода о локализации 5-НТ_{1b}-рецепторов на энтеральных нейронах.

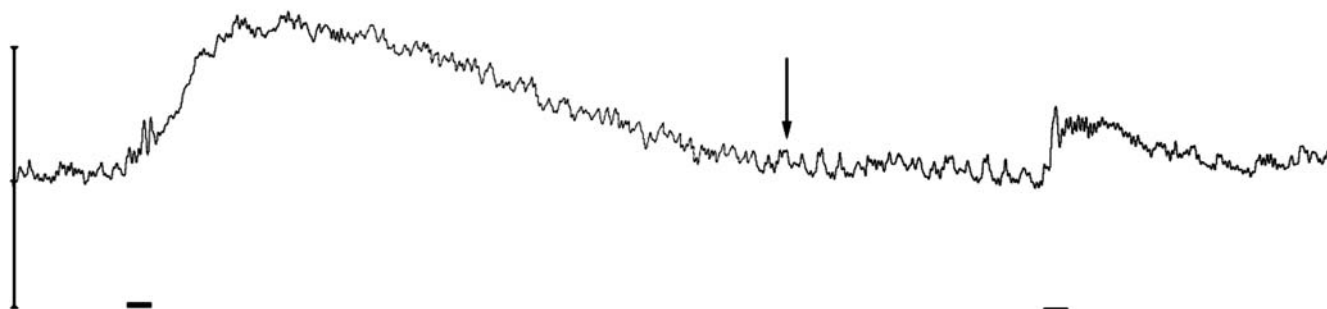
SB 204741 — блокатор 5-НТ_{2b}-рецепторов, практически не изменял выраженность стимуляторных реакций на серотонин на желудке: введение препарата снизило прирост давления лишь на 8%. На двенадцатиперстной и толстой кишке реакции устранялись полностью. Согласно нашей концепции, 5-НТ_{2b}-рецепторы преимущественно располагаются на гладких мышцах кишечника и на нейронах, иннервирующих желудок.

Введение MDL-72222 также сохраняло ответы на серотонин, однако на двенадцатиперстной кишке эффект уменьшился практически в 2 раза (рисунок).

Налицо гетерогенность распределения 5-НТ₃-рецепторов: если в желудке и толстой кишке они расположены преимущественно в области вегетативных ганглиев, то в двенадцатиперстной кишке нельзя исключить их наличия на гладкой мускулатуре. Вместе с тем, 5-НТ₃-рецепторы, как убедительно показали работы M.D. Gershon [8, 9], выполняют ведущую

роль в реализации перистальтического рефлекса: выделяясь из энтерохромаффинных клеток и нейронов, они активизируют 5-НТ₃-рецепторы слизистой и стимулируют сокращения кишки. Если предположить, что описанный авторами рефлекторный механизм, который активно задействует 5-НТ₃-рецепторы, представляет собой основу регуляции моторики для данного отдела ЖКТ, наши данные можно интерпретировать иным образом. В пользу нейрональной локализации 5-НТ₃-рецепторов свидетельствует и тот факт, что наибольшее количество энтерохромаффинных клеток располагается именно в слизистой двенадцатиперстной кишки [8].

Различия в распределении характерны и для 5-НТ₄-рецепторов. Так, использование RS 39604 — блокатора указанных рецепторов приводило к полному выключению стимуляторных реакций на желудке и частичному сохранению ответов на двенадцатиперстной и восходящей ободочной кишке. При этом на двенадцатиперстной кишке прирост давления снижался в 1,4 раза, а на толстой — почти в 3 раза. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что 5-НТ₄-рецепторы преимущественно расположены на гладких мышцах желудка и энтеральных нейронах двенадцатиперстной и восходящей ободочной кишки.



Уменьшение выраженности стимуляторного ответа на серотонин на фоне продолжающегося действия адreno-блокаторов и MDL 72222 (момент введения показан стрелкой). Регистрация внутриполостного давления в двенадцатиперстной кишке крысы. Шкала 10 мм рт.ст.; жирная линия внизу — отметки введения серотонина продолжительностью 30 с.

Отсутствие существенных изменений моторики при введении различных блокаторов 5-HT-рецепторов позволяет сделать предварительный вывод о том, что изучаемые серотонинреактивные структуры не обладают тоническим воздействием на желудочно-кишечный тракт.

Таким образом, результаты нашего исследования позволяют сделать заключение о том, что серотонинреактивные структуры широко распространены во всех отделах пищеварительной трубки. Они вносят существенный вклад в нервную регуляцию моторики. По нашим данным, 5-HT_{1b,3}-рецепторы преимущественно расположены на вегетативных ганглиях желудка и кишечника. 5-HT_{2b}-рецепторы находятся на нейронах, участвующих в моторной регуляции стенки желудка, а также на гладких мышцах тонкой и толстой кишки. 5-HT₄-рецепторы локализируются, в основном, на гладких мышцах желудочной стенки и нейронах, обеспечивая регуляцию моторики кишечника.

Полученные данные позволяют существенно расширить теоретические представления о нервной регуляции моторики желудочно-кишечного тракта и функциональной организации вегетативной нервной системы, тем самым стимулируя создание новых, нетоксичных фармакологических препаратов-прокинетики и модуляторов моторики, что позволит создавать новые схемы лечения таких заболеваний, как синдром раздраженного кишечника и послеоперационные парезы.

Список литературы

1. Свешников Д.С., Смирнов В.М., Мясников И.Л., Кучук А.В. Исследование природы нервных волокон симпатического ствола, вызывающих усиление сокращений желудка. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2011; 152 (9): 249—52.
2. Свешников Д.С., Смирнов В.М., Мясников И.Л., Трофимова Ю.Е. Роль холино- и адrenoблокаторов в развитии стимуляторных реакций восходящей ободочной кишки, вызванных введением серотонина адипината. *Российский медицинский журнал*. 2011; 5: 43—6
3. Смирнов В.М., Мясников И.Л., Берсенева Е.А., Свешников Д.С. Изучение механизма стимуляторного влияния симпатического нерва на сокращения желудка. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 1999; 8: 1095—102.
4. Терехина И.Л., Надеев А.Д., Кожевникова Л.М., Гончаров Н.В., Авдонин П.В. 5HT_{1B} И 5HT_{2B}-рецепторы вызывают увеличение концентрации ионов кальция в эндотелиальных клетках кровеносных сосудов. *Патогенез*. 2012; 10 (1): 70—2.
5. Bulbring E., Crema A. Observations concerning the action of 5-hydroxytryptamine on the peristaltic reflex. *Br. J. Pharmacol.* 1958; 13: 444—57.

6. Dorn S.D. Irritable bowel syndrome subtypes defined by Rome II and Rome III criteria are similar. Dorn S.D., Morris C.B., Hu Y. *J. Clin. Gastroenterol.* 2009; 43: 214—20.

7. Erspamer V. Concerning the 5-hydroxytryptamine (enteramine) content of the gastrointestinal tract lining. *Naturwissenschaften*. 1953; 40: 318—9.

8. Gershon M.D. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 2013; 20 (1): 14—21.

9. Gershon M.D. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. Gershon M.D., Tack J. *Gastroenterology*. 2007; 132 (1): 397—414.

10. Hoffman J.M. Activation of colonic mucosal 5-HT (4) receptors accelerates propulsive motility and inhibits visceral hypersensitivity. Hoffman J.M., Tyler K., MacEachern S.J. et al. *Gastroenterology*. 2012; 142 (4): 844—54

11. Keating D.J., Spencer N.J. Release of 5-hydroxytryptamine from the mucosa is not required for the generation or propagation of colonic migrating motor complexes. *Gastroenterology*. 2010; 138: 659—70.

12. Minocha A. Prevalence, sociodemography, and quality of life of older versus younger patients with irritable bowel syndrome: a population-based study. Minocha A., Johnson W.D., Abell T.L., Wigginton W.C. *Dig. Dis. Sci.* 2006; 51: 446—53.

13. Patel B.A. In vitro continuous amperometric monitoring of 5-hydroxytryptamine release from enterochromaffin cells of the guinea pig ileum Patel B.A., Bian X., Quaiserova-Mocko V. et al. *Analyst*. 2007; 132: 41—7.

14. Smith T.K. Controversies involving the role of 5-hydroxytryptamine in generating colonic migrating motor complexes: what is spontaneous? Smith T.K., Dickson E.J., Heredia D.J. et al. *Gastroenterology*. 2010; 138: 1213—4.

15. Wood J. Enteric nervous system: reflexes, pattern generators and motility. Wood J.D. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2008; 24 (2): 149—58.

16. Wouters M. 5-HT receptors on interstitial cells of Cajal, smooth muscle and enteric nerves. Wouters M.M., Farrugia G., Schemann M. *Neurogastroenterol. Motil.* 2007; 19 (2): 5—12.

References

1. Sveshnikov D.S., Smirnov V.M., Mjasnikov I.L., Kuchuk A.V. Study of the nature of sympathetic trunk nerve fibers enhancing gastric motility. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2011; T.152; 9: 249—252. (in Russian).
2. Sveshnikov D.S., Smirnov V.M., Mjasnikov I.L., Trofimova Ju.E. Role of cholino- and adreno-blockers in the development of stimulatory response in the ascending colon, which are caused by serotonin adipate. *Rossiiskij Medicinskij Zhurnal*. 2011; 5: 43—46. (in Russian).
3. Smirnov V.M., Mjasnikov I.L., Berseneva E.A., Sveshnikov D.S. Study of the stimulating effect of the sympathetic trunk on the stomach contraction. *Rossiiskij Fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova*. 1999; 8: 1095—1102. (in Russian).
4. Terехина I.L., Nadeev A.D., Kozhevnikova L.M., Goncharov N.V., Avdonin P.V. 5HT_{1B} and 5HT_{2B}-receptors causes to rise of Calcium ions in vascular Endotheliocytes. *Pathogenesis*. 2012; 1 (10): 70—72. (in Russian).
5. Bulbring E., Crema A. Observations concerning the action of 5-hydroxytryptamine on the peristaltic reflex. *Br. J. Pharmacol.* 1958; 13: 444—457.
6. Dorn S.D., Morris C.B., Hu Y.J. Irritable bowel syndrome subtypes defined by Rome II and Rome III criteria are similar. *Gastroenterol.* 2009; 43: 214—220.

7. Erspamer V. Concerning the 5-hydroxytryptamine (enteramine) content of the gastrointestinal tract lining. *Naturwissenschaften*; 1953; 40: 318—319.
8. Gershon M.D. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes.* 2013; 20(1): 14—21.
9. Gershon M.D., Tack J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology*. 2007; Vol.132; 1: 397—414.
10. Hoffman J.M., Tyler K., MacEachern S.J. et al. Activation of colonic mucosal 5-HT (4) receptors accelerates propulsive motility and inhibits visceral hypersensitivity. *Gastroenterology*; 2012; 142(4): 844—854
11. Keating D.J., Spencer N.J. Release of 5-hydroxytryptamine from the mucosa is not required for the generation or propagation of colonic migrating motor complexes. *Gastroenterology*; 2010; 138: 659—670.
12. Minocha A., Johnson W.D., Abell T.L., Wington W.C. Prevalence, sociodemography, and quality of life of older versus younger patients with irritable bowel syndrome: a population-based study. *Dig. Dis. Sci.* 2006; 51: 446—453.
13. Patel B.A., Bian X., Quaiserova-Mocko V. et al. In vitro continuous amperometric monitoring of 5-hydroxytryptamine release from enterochromaffin cells of the guinea pig ileum. *Analyst*; 2007; 132: 41—47.
14. Smith T.K., Dickson E.J., Heredia D.J. et al. Controversies involving the role of 5-hydroxytryptamine in generating colonic migrating motor complexes: what is spontaneous? *Gastroenterology*. 2010; 138: 1213—1214.
15. Wood J. Enteric nervous system: reflexes, pattern generators and motility. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2008; 2(24): 149—158.
16. Wouters M.M., Farrugia G., Schemann M. 5-HT receptors on interstitial cells of Cajal, smooth muscle and enteric nerves. *Neurogastroenterol. Motil.* 2007; Suppl. 2 (18): 5—12.

Поступила 27.06.14
Received 27.06.14

Сведения об авторах:

Торшин Владимир Иванович (Torshin V.I.) — д.б.н., профессор, зав. кафедрой нормальной физиологии медицинского факультета Российского университета дружбы народов, e-mail: vtorshin@mail.ru

Смирнов Виктор Михайлович (Smirnov V.M.) — д.б.н., профессор кафедры нормальной физиологии медицинского факультета Российского университета дружбы народов, e-mail: vmsmirnov1@gmail.com

Кучук Андрей Владимирович (Kuchuk A.V.) — к.м.н., доцент кафедры нормальной физиологии медицинского факультета Российского университета дружбы народов, e-mail: verlord@mail.ru

Мясников Игорь Леонидович (Myasnikov I.L.) — к.м.н., доцент кафедры нормальной физиологии медицинского факультета Российского университета дружбы народов, e-mail: mil@mail.ru

Гребнев Д.Ю.

Возможность использования сочетанной трансплантации стволовых клеток для активации гемопоэза у старых и зрелых лабораторных животных в условиях воздействия ионизирующего излучения

ГБУЗСО «Институт медицинских клеточных технологий», 620000, Екатеринбург, ул. Соболева, 21
ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава России, 620000, Екатеринбург, ул. Репина, 3

Цель работы — изучение влияния сочетанной трансплантации стволовых клеток — мультипотентных мезенхимальных стромальных (ММСК) и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) на гемопоэз старых и зрелых лабораторных животных в условиях воздействия ионизирующего излучения. Эксперименты выполнены на 36 белых лабораторных мышах-самцах в возрасте 3—4 мес., массой 30 г (зрелые животные) и 36 мышах-самцах в возрасте 3 лет, массой 50 г (старые животные). Эксперименты по получению культуры ММСК и ГСК выполнены на 16 лабораторных животных мышах-самках в возрасте 3—4 мес., массой 30 г, срок гестации 18 сут. Контрольную группу составили 18 зрелых и старых животных, не подвергшихся облучению. Животных опытной группы подвергали воздействию ионизирующего излучения (ИИ) в дозе 4,0 Гр. Животным опытных подгрупп внутривенно вводили суспензию ММСК и ГСК соответственно в дозе 6 млн кл/кг и 330 тыс. кл./кг, контрольным подгруппам вводили 0,9%-ный раствор NaCl — 0,2 мл внутривенно. Инъекции осуществляли однократно через 1 ч после облучения. Показано, что в физиологических условиях сочетанная трансплантация ММСК и ГСК зрелым и старым лабораторным животным приводит к активации эритропоэза, в условиях воздействия ИИ — к активации эритро и гранулоцитопоэза. Кроме того, сочетанная трансплантация ММСК и ГСК оказывает цитопротективное действие на миелоидную ткань за счет уменьшения содержания цитогенетически измененных клеток у зрелых животных в условиях воздействия ИИ, тогда как у старых животных этот эффект проявляется и в физиологических условиях.

Ключевые слова: гемопоэз, миелоидная ткань, старение, ионизирующее излучение, стволовые клетки

Grebnev D.U.

The opportunity to use combined stem cells transplantation for haemopoiesis activation in the old and mature laboratory animals under the conditions of ionizing radiation

The objective of this work was to study the influence of combined transplantation of stem cells (multipotent mesenchymal stromal and hemopoietic stem cells) on the haemopoiesis of old and mature laboratory animals under the condition of ionizing radiation. The experiments were conducted on 48 white male mice with the body weight of 30 g, age of 3—4 months, and 48 male mice of 3 years of age and body mass of 50 g. The experiments for obtaining the MMSC and HSC cultures were conducted on 16 laboratory animals: female mice of 3—4 months of age and body mass of 30 g., 18 days gestation period. The control group was formed by the animals not under the ionizing radiation. The experimental group animals got the dose of 4 Gr. These animals also got MMSC and HSC mixture intravenously in the doses of 6 mln. c/kg. and 330 thousand cell/kg prospectively. The control group animals got the 0,9% NaCl — 0,2 ml. intravenously. The infusions were made 1 hour after radiation once. As the result of the experiment it was shown that under physiological conditions combined transplantation brings the erythropoiesis activation, under the ionizing radiation conditions it brings the erythroid and granulocytogenesis activation. More over the combined MMSC and HSC transplantation gives cytoprotective action on the myeloid tissue due to decrease of cytogenetically changed cells in the mature animals under the condition of ionizing radiation, but in the old animals this effect can be seen even under physiological condition. Conclusions: Combined transplantation of MMSC and GSC can be used in the mature and old laboratory animals under the conditions of ionising radiation for the haemopoiesis activation.

Key words: haemopoiesis, myeloid tissue, aging, ionizing radiation, stem cells

Для корреспонденции: Гребнев Дмитрий Юрьевич — к.м.н., ст. науч. сотр. ГБУЗСО «Институт медицинских клеточных технологий», 620000, Екатеринбург, ул. Соболева, 21; ассистент каф. патологической физиологии ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава России, 620000, Екатеринбург, ул. Репина, 3

Трансплантация стромальных клеток здорового донора способна ускорять процесс приживания трансплантата гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и, соответственно процесс восстановления гемопоэза [1]. Эффективность применения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) в качестве котрансплантата при введении ГСК обусловлена следующим:

1. ММСК стимулируют ряд важных гемопоэтических факторов, таких, как IL-6 (интерлейкин 6), IL-11 (интерлейкин 11), LIF (лейкемический ингибиторный фактор), SCF (фактор стволовых клеток);

2. ММСК экспрессируют на своей поверхности протеины экстрацеллюлярного матрикса, участвующие в хоуминге стволовых клеток, в том числе: VCAM1, E-селектин, коллаген I типа и фибронектин. ММСК дифференцируются в клетки стромы, способные синтезировать экстрацеллюлярный матрикс, формирующий костномозговое микроокружение, необходимое клеткам гемопоэза. Иммуносупрессивное действие ММСК обусловлено способностью экспрессировать фермент индоламин-2,3-диоксигеназу, выработкой простагландина E, трансформирующего фактора роста (TGF) и др. [4, 5]. Известно, что с возрастом происходит существенное уменьшение содержания стволовых клеток в организме. Учитывая свойства ММСК, представляется перспективным восстановление активности гемопоэза в условиях возрастной инволюции проведением сочетанной заместительной клеточной терапии [3].

Методика

Эксперименты выполнены на 36 белых лабораторных мышках-самцах в возрасте 3—4 мес. (зрелые), массой 30 г и 36 мышках-самцах в возрасте 3 лет, массой 50 г. Эксперименты по получению культуры ММСК и ГСК выполнены на 16 мышках-самцах в возрасте 3—4 мес., массой 30 г, срок гестации 18 дней [2].

Выделение гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) из плаценты осуществляли методом прямой иммуномагнитной сепарации (ПИМС) с использованием следующих наборов:

1. Mouse CD117(cKIT) Selection Cocktail (StemCell Technologies, США);

2. Mouse SCA1 POSITIVE Selection KIT (StemCell Technologies, США).

После проведенных ПИМС во фракции трансплантируемых клеток оценивали содержание ГСК с иммунофенотипом CD117+, Sca-1+, Lin- на точном цитометре BD FACSCalibur.

Состав Lin- (BD Biosciences):

- Anti-mouse CD3e, clone 145-2C11;

- Anti-mouse CD45R/B220, clone RA3-6B2;
- Anti-mouse TER-119/Erythroid Cell, clone TER-119;
- Anti-mouse CD11, clone M1/70;
- Anti-mouse Ly-6G and Ly-6C (Gr-1), clone RB6-8C5.

Содержание клеток с иммунофенотипом CD117+, Sca-1+, Lin- составило 85—93%. Жизнеспособность клеток, определенная с использованием трипанового синего составила 95—97%.

Выделение мононуклеарной фракции клеток из плодной части плаценты

Оперативным путем в стерильных условиях производили отделение плаценты от полости матки. С целью удаления крови плодная часть плаценты была промыта стерильным фосфатным буфером pH 7,2 — Dulbecco's phosphatebuffered saline (DPBS; StemCell Technologies, США), содержащем раствор пенициллина 50 ед./мл и стрептомицина 50 мкг/мл. После измельчения плодной части плаценты с целью разрушения межклеточных контактов было добавлено 5 мл однократного раствора ацетаза (Millipore, США). Полученная суспензия была инкубирована на шейкере при медленном покачивании в течение 10 мин при температуре 37°C. С целью удаления дебриса суспензия клеток была профильтрована через фильтры на 70 мкм (Millipore, США). Для выделения мононуклеарной фракции настоящая суспензия была нанесена на раствор лимфолайт-М (StemCell Technologies, США) в соотношении 1:1 и центрифугирована при 1000 g в течение 20 мин. К выделенной мононуклеарной фракции было добавлено 8 мл Dulbecco's phosphatebuffered saline (StemCell Technologies, США). С целью отмывки клеток от лимфолайт-М проведено центрифугирование при 300 g в течение 10 мин. Нулевой пассаж осуществляли в чашки Петри диаметром 6 см в концентрации 1 млн клеток на 1 см².

Идентификация ММСК иммуноцитохимическим методом проводилась с использованием набора — MILLIPORE®'s Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit. Этот набор содержит панель позитивных и негативных маркеров, характеризующих популяцию мультипотентных стволовых клеток. Позитивные маркеры включают антитела, направленные против антигенов, расположенных на поверхности клеток — интегрин-β1, CD54, а также антитела к молекулам внеклеточного матрикса, формирующихся в культуре ММСК — фибронектину и коллагену I типа. К негативным маркерам для мезенхимальных стволовых клеток относятся специфичные антигены гемопоэтических клеток — CD14 и CD45. Также идентификация ММСК была определена по их способности дифференцироваться в остеогенном и адипогенном направлении.

Животные были разделены на две группы (контрольную и опытную). Контрольную группу составили зрелые и старые животные, не подвергшиеся облучению. Животные опытной группы были подвержены воздействию ионизирующего излучения в дозе 4,0 Гр. В эксперименте облучение животных проводилось на гамма-терапевтической установке типа АГАТ-С с радиоактивным источником ^{60}Co типа ГИК -8 — 4. Мощность поглощенной дозы 15 сГр/мин. При этом в каждой группе (опытной и контрольной) были выделены первая и вторая подгруппы. Животным первых подгрупп внутривенно вводили суспензию ММСК и ГСК соответственно в дозе 6 млн кл./кг и 330 тыс. кл./кг. Животным вторых подгрупп вводили 0,9%-ный раствор NaCl — 0,2 мл внутривенно. Внутривенные введения осуществляли через 1 ч после облучения однократно. Ретикулоциты подсчитывали в окрашенных бриллиант-крезил-блау мазках крови (на 2000 эритроцитов) с последующим переводом результата в единицы СИ — гига на литр (Г/л). Мазки костного мозга из бедренной кости окрашивали по Нохту. Подсчет миелограммы производили на 500 клеток. Определяли общее количество миелокари-

оцитов в костном мозге бедренной кости. С целью определения содержания цитогенетически измененных клеток производился микроядерный тест.

$$\text{МЯТ} = \left(\frac{\text{Число полихроматофильных эритроцитов с микроядрами}}{1000 \text{ полихроматофильных эритроцитов}} \right) \times 1000\%$$

Цитологические препараты костного мозга и периферической крови анализировали с помощью микроскопа Micros MC-50 (Австрия) при увеличении 100 x 15.

Для каждого ряда значений показателя вычисляли среднюю арифметическую, стандартную ошибку среднего. Значимость отличий между подгруппами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На 1-е сут. после проведения сочетанной трансплантации ММСК и ГСК в физиологических условиях, а также на фоне воздействия ИИ отмечено, что изучаемые показатели не отличаются от контрольных. При анализе миелограммы зрелых лабораторных жи-

Таблица 1

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости зрелых и старых лабораторных мышей на 7 сутки, $M \pm m$

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн кл./бедро)			
		Зрелые		Старые	
		NaCl (вторая подгруппа), n = 9	Стволовые клетки (первая подгруппа), n = 9	NaCl (вторая подгруппа), n = 9	Стволовые клетки (первая подгруппа), n = 9
Миелокарициты (общее число)		12,33 ± 1,67	14,33 ± 2,00	9,42 ± 0,68	9,57 ± 0,61
Нейтрофильные клетки	Миелобласты	0,21 ± 0,05	0,24 ± 0,04	0,12 ± 0,02	0,13 ± 0,02
	Промиелоциты	0,17 ± 0,03	0,20 ± 0,06	0,09 ± 0,02	0,11 ± 0,02
	Миелоциты	0,24 ± 0,04	0,27 ± 0,04	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,02
	Метамиелоциты	0,61 ± 0,07	0,62 ± 0,04	0,29 ± 0,02	0,27 ± 0,04
	Палочкоядерные и сегментоядерные	5,10 ± 0,59	5,84 ± 0,04	4,37 ± 0,47	4,70 ± 0,33
Эозинофилы (всех генераций)		0,22 ± 0,05	0,22 ± 0,05	0,13 ± 0,03	0,12 ± 0,02
Все гранулоцитарные элементы		6,53 ± 0,67	7,39 ± 0,60	5,12 ± 0,46	5,47 ± 0,29
Эритробласты		0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,013	0,06 ± 0,01
Нормобласты	Базофильные	0,52 ± 0,08	0,58 ± 0,06	0,27 ± 0,04	0,35 ± 0,03 #
	Полихроматофильные	1,53 ± 0,07	2,30 ± 0,35 *	0,82 ± 0,09	1,13 ± 0,17 #
	Оксифильные	0,09 ± 0,03	0,07 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,09
Все эритроидные элементы		2,17 ± 0,14	2,99 ± 0,36 *	1,15 ± 0,10	1,56 ± 0,19 #
Лимфоциты		3,44 ± 0,34	3,42 ± 0,04	2,72 ± 0,22	2,68 ± 0,25
Прочие		0,37 ± 0,06	0,35 ± 0,06	0,26 ± 0,04	0,26 ± 0,03
Индекс созревания нейтрофилов		0,24 ± 0,02	0,23 ± 0,04	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,01
Индекс созревания эритрономобластов		0,75 ± 0,02	0,79 ± 0,02	0,73 ± 0,04	0,74 ± 0,03
Гранулоцитарно-эритробластическое отношение		3,03 ± 0,41	2,52 ± 0,40	4,49 ± 0,52	3,56 ± 0,35

Примечание. * — отличие от зрелых животных без облучения, после введения NaCl, достоверно с $p < 0,05$; ** — отличие от подгруппы зрелых животных после воздействия ионизирующего излучения, после введения NaCl, достоверно с $p < 0,05$; # — отличие от старых животных без облучения, после введения NaCl, достоверно с $p < 0,05$; ## — отличие от старых животных после воздействия ионизирующего излучения, после введения NaCl, достоверно с $p < 0,05$.

вотных на 7-е сут. после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК в эритроидном ростке выявлено увеличение содержания полихроматофильных нормобластов на 50,3% ($2,30 \pm 0,35$ млн кл./бедро, $p < 0,05$) по сравнению со второй подгруппой ($1,53 \pm 0,07$ млн кл./бедро). Это привело к увеличению общего содержания эритроидных элементов на 37,8% ($2,99 \pm 0,3$ млн кл./бедро, $p < 0,05$) относительно соответствующего показателя второй подгруппы ($2,17 \pm 0,14$ млн кл./бедро). Содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани соответствовало значению спонтанного уровня мутагенеза. В то же время у старых лабораторных животных установлено существенное увеличение содержания базофильных нормобластов ($0,35 \pm 0,03$ млн кл./бедро, $p < 0,05$) и полихроматофильных нормобластов ($1,13 \pm 0,17$ млн кл./бедро, $p < 0,05$) соответственно на 29,6% и 37,8% по сравнению с показателями второй подгруппы: $0,27 \pm 0,04$ млн кл./бедро и $0,82 \pm 0,09$ млн кл./бедро соответственно. Указанные изменения привели к увеличению общего содержания эритроидных элементов в костном мозге на 35,6% по сравнению с контролем. При анализе гранулоцитарно-

го дифферона зрелых и старых животных не отмечено существенных отличий относительно второй подгруппы (табл. 1).

При анализе микроядерного теста старых животных обнаружено уменьшение содержания полихроматофильных эритроцитов с микроядрами относительно контроля на 30,0% ($2,45 \pm 0,30\%$, $p < 0,05$). Выявленные изменения в костном мозге соответствовали установленным изменениям в периферической крови, где отмечено увеличение содержания ретикулоцитов ($170,83 \pm 8,17$ Г/л, $p < 0,05$) как у зрелых, так и у старых лабораторных животных ($130,67 \pm 7,00$ Г/л, $p < 0,05$).

При анализе миелограммы зрелых животных на 7-е сут. после воздействия повреждающего фактора на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК (табл. 2) выявлено восстановление до значений нормы миелобластов, увеличение содержания миелобластов, миелоцитов, а также палочкоядерных и сегментоядерных форм лейкоцитов соответственно на 75,3%, 51,1% и 21,7% относительно контрольной подгруппы. Эти изменения приводили к активации гранулоцитопоза и увеличению общего содержания гранулоцитов на

Таблица 2

Содержание клеток костного мозга в бедренной кости лабораторных мышей на 7-е сут. после воздействия ИИ ($M \pm m$, $n = 9$)

Наименование клеточных элементов		Содержание клеток (млн кл./бедро)			
		Зрелые		Старые	
		NaCl (контрольная подгруппа)	Стволовые клетки	NaCl (контрольная подгруппа)	Стволовые клетки
Миелокариоциты (общее число)		$7,98 \pm 1,35$ *	$10,07 \pm 0,83$ * **	$6,28 \pm 0,72$ °	$7,82 \pm 0,95$
Нейтрофильные клетки	Миелобласты	$0,15 \pm 0,03$	$0,26 \pm 0,03$ **	$0,09 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,03$
	Промиелоциты	$0,11 \pm 0,02$ *	$0,13 \pm 0,02$ *	$0,07 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,02$
	Миелоциты	$0,15 \pm 0,03$ *	$0,22 \pm 0,03$ **	$0,09 \pm 0,02$ °	$0,15 \pm 0,02$ °°
	Метамиелоциты	$0,42 \pm 0,02$ *	$0,47 \pm 0,02$ *	$0,21 \pm 0,02$ °	$0,26 \pm 0,02$ °°
	Палочкоядерные и сегментоядерные	$3,40 \pm 0,06$ *	$4,14 \pm 0,05$ **	$3,18 \pm 0,38$ °	$4,13 \pm 0,30$ °°
Эозинофилы (всех генераций)		$0,14 \pm 0,02$ *	$0,16 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,02$ °	$0,11 \pm 0,02$
Все гранулоцитарные элементы		$4,35 \pm 0,40$ *	$5,38 \pm 0,19$ * **	$3,74 \pm 0,39$ °	$4,86 \pm 0,31$ °°
Эритробласты		$0,022 \pm 0,004$ *	$0,02 \pm 0,01$ *	$0,028 \pm 0,005$	$0,04 \pm 0,003$ °°
Нормобласты	Базофильные	$0,30 \pm 0,07$ *	$0,40 \pm 0,04$ *	$0,19 \pm 0,04$ °	$0,27 \pm 0,02$ °°
	Полихроматофильные	$1,15 \pm 0,04$ *	$1,34 \pm 0,06$ **	$0,59 \pm 0,07$ °	$0,78 \pm 0,04$ °°
	Оксифильные	0 *	$0,05 \pm 0,05$	$0,01 \pm 0,006$	$0,02 \pm 0,01$
Все эритроидные элементы		$1,48 \pm 0,08$ *	$1,80 \pm 0,08$ * **	$0,82 \pm 0,10$ °	$1,11 \pm 0,06$ °°
Лимфоциты		$1,67 \pm 0,33$ *	$1,93 \pm 0,14$	$1,90 \pm 0,20$ °	$2,35 \pm 0,35$ °°
Прочие		$0,21 \pm 0,02$ *	$0,24 \pm 0,04$ *	$0,19 \pm 0,03$ °	$0,21 \pm 0,02$
Индекс созревания нейтрофилов		$0,25 \pm 0,03$	$0,26 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,03$	$0,15 \pm 0,01$
Индекс созревания эритрономобластов		$0,78 \pm 0,03$	$0,77 \pm 0,02$	$0,73 \pm 0,04$	$0,72 \pm 0,02$
Гранулоцитарно-эритробластическое отношение		$2,95 \pm 0,21$	$2,99 \pm 0,16$	$4,67 \pm 0,89$	$4,37 \pm 0,34$

Примечание. * — отличие от группы зрелых интактных животных (контрольная группа), достоверно с $p < 0,05$; ** — отличие от подгруппы зрелых интактных животных после воздействия ионизирующего излучения (контрольная подгруппа), достоверно с $p < 0,05$; ° — отличие от группы старых интактных животных (контрольная группа), достоверно с $p < 0,05$; °° — отличие от подгруппы старых интактных животных после воздействия ионизирующего излучения (контрольная подгруппа), достоверно с $p < 0,05$.

23,6% ($5,38 \pm 0,19$ млн кл./бедро, $p < 0,05$). В эритроидном диффероне зрелых животных выявлено увеличение содержания полихроматофильных нормобластов ($1,34 \pm 0,06$ млн кл./бедро, $p < 0,05$). При этом отмечено увеличение общего содержания эритроидных элементов на 22,1%. В то же время у старых мышей в эритроидном диффероне отмечено увеличение содержания эритробластов на 37,9%, базофильных на 42,1%, полихроматофильных нормобластов на 32,3%, увеличению общего содержания эритроидных элементов на 35,6% по сравнению со второй подгруппой. В гранулоцитарном диффероне старых мышей обнаружено восстановление содержания до значений нормы миелобластов и промиелоцитов. Также выявлено увеличение содержания миелоцитов, метамиелоцитов, а также палочкоядерных и сегментоядерных форм нейтрофилов относительно второй подгруппы. Описанные изменения соответствовали восстановлению до значений нормы общего содержания гранулоцитарных элементов старых животных. Обнаружено увеличение содержания лимфоцитов относительно второй подгруппы на 23,7% (табл. 2).

Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами у зрелых и старых животных не только снизилось относительно второй подгруппы, но и соответствовало значениям спонтанного уровня мутагенеза (СУМ) (табл. 3).

При анализе данных периферической крови зрелых и старых животных выявлены изменения (табл. 4), соответствующие ранее установленным в костном мозге. Так, отмечено увеличение содержания ретикулоцитов, лейкоцитов относительно второй подгруппы.

Таким образом, в физиологических условиях сочетанная трансплантация ММСК и ГСК зрелым и старым лабораторным животным приводит к активации эритропоэза, в условиях воздействия ИИ — к активации эритро- и гранулоцитопоэза. Кроме того, сочетанная трансплантация ММСК и ГСК оказывает цитопротективное действие на миелоидную ткань за счет уменьшения содержания цитогенетически измененных клеток у зрелых животных в условиях воздействия ИИ, тогда как у старых животных этот эффект проявляется и в физиологических условиях.

Таблица 3

Содержание цитогенетически измененных клеток в миелоидной ткани зрелых и старых лабораторных мышей на 7-е сут. после воздействия ИИ дозой 4,0 Гр ($M \pm m$)

Параметр	Зрелые		Старые	
	NaCl (вторая подгруппа), n = 9	Стволовые клетки (первая подгруппа), n = 9	NaCl (вторая подгруппа), n = 9	Стволовые клетки (первая подгруппа), n = 9
Содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядрами, %	$7,87 \pm 0,95$ *	$2,91 \pm 0,38$ **	$6,10 \pm 0,50$ °	$3,75 \pm 0,32$ °°

Примечание. * — отличие от зрелых животных без облучения, после введения NaCl, достоверно с $p < 0,05$; ** — отличие от зрелых животных после воздействия ионизирующего излучения, после введения NaCl, достоверно с $p < 0,05$; ° — отличие от старых животных без облучения, после введения NaCl, достоверно с $p < 0,05$; °° — отличие от старых животных после воздействия ионизирующего излучения, после введения NaCl, достоверно с $p < 0,05$.

Таблица 4

Показатели периферической крови зрелых и старых лабораторных мышей на 7-е сут. после воздействия ИИ дозой 4,0 Гр ($M \pm m$)

Наименование клеточных элементов	Содержание клеток (Г/л)			
	Зрелые		Старые	
	NaCl (вторая подгруппа), n = 9	Стволовые клетки (первая подгруппа), n = 9	NaCl (вторая подгруппа), n = 9	Стволовые клетки (первая подгруппа), n = 9
Ретикулоциты	$98,83 \pm 9,50$ *	$123,17 \pm 9,50$ * **	$85,50 \pm 10,50$ °	$111,00 \pm 9,33$ °°
Лейкоциты (общее содержание)	$7,47 \pm 1,20$ *	$9,72 \pm 0,49$ * **	$6,40 \pm 0,33$ °	$7,72 \pm 0,72$ °°
Гранулоциты	$1,82 \pm 0,52$ *	$2,27 \pm 0,29$ * **	$1,72 \pm 0,36$ °	$2,15 \pm 0,23$ °°
Лимфоциты	$5,80 \pm 0,67$ *	$7,17 \pm 0,34$ **	$4,83 \pm 0,40$ °	$5,83 \pm 0,54$ °°
Моноциты	$0,37 \pm 0,05$ *	$0,43 \pm 0,05$	$0,20 \pm 0,02$ °	$0,20 \pm 0,04$

Примечание. * — отличие от зрелых животных без облучения, после введения NaCl, достоверно с $p < 0,05$; ** — отличие от зрелых животных после воздействия ионизирующего излучения, после введения NaCl, достоверно с $p < 0,05$; ° — отличие от старых животных без облучения, после введения NaCl, достоверно с $p < 0,05$; °° — отличие от старых животных после воздействия ионизирующего излучения, после введения NaCl, достоверно с $p < 0,05$.

Список литературы

References

1. Гребнев Д.Ю. Перспектива применения сочетанной трансплантации стволовых клеток для восстановления гемопоэза. *Вестник уральской медицинской академической науки*. 2012; 3 (40): 67—8.
2. Reyes M., Verfaillie C.M. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2001; 938: 231—3; discussion 233—5.
3. Wagers A.J., Weissman I.L. Plasticity of Adult Stem Cells. *Cell*. 2004; 116: 639—48.
4. Ястребов А.П., Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю. Экспериментальное обоснование использования сочетанной трансплантации стволовых клеток для коррекции регенерации быстрообновляющихся тканей после лучевого повреждения. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2012; 2 (39): 141.
5. Сериков В.Б., Куйперс Ф. Плацента человека как источник гемопоэтических стволовых клеток. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2008; III (2): 51—6.

1. Grebnev D.Ju. Perspektiva primenenija sochetannoj transplantacii stvolovyh kletok dlja vosstanovlenija gemopojezha. *Vestnik ural'skoj medicinskoj akademicheskoj nauki*. 2012; 3 (40): 67—8. (in Russian)
2. Reyes M., Verfaillie C.M. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann. NY Acad. Sci.* 2001. — 938. 231—3; discussion 233—5.
3. Wagers A.J., Weissman I.L. Plasticity of Adult Stem Cells. *Cell*. 2004; 116: 639—48.
4. Jastrebov A.P., Grebnev D.Ju., Maklakova I.Ju. eksperimental'noe obosnovanie ispol'zovanija sochetannoj transplantacii stvolovyh kletok dlja korrekcii regeneracii bystroobnovljajushhihsja tkanej posle lucheвого povrezhdenija. *Vestnik Ural'skoj medicinskoj akademicheskoj nauki*. 2012; 2 (39): 141. (in Russian)
5. Serikov V.B., Kujpers F. Placenta cheloveka kak istocchnik gemopojeticheskikh stvolovyh kletok. *Kletochnaja transplantologija i tkanevaja inzhenerija*. 2008; III (2): 51—6. (in Russian)

Поступила 30.12.13
Received 30.12.13

Вахнин В.А., Брюхин Г.В.

Когнитивные расстройства и повышенная свободнорадикальная активность мозга потомства крыс-самок с экспериментальной хронической алкогольной патологией печени

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования
Южно-Уральский государственный медицинский университет, 454092, Челябинск, ул. Воровского, 64

Установлено, что хроническое алкогольное поражение гепатобилиарной системы ведет к нарушению когнитивных функций у потомства. У данной группы животных выявлено нарушение памяти и способности к ориентации в пространстве в условиях водного лабиринта Морриса, угнетено исследовательское поведение. Кроме того, животные, рожденные от матерей с хронической алкогольной патологией гепатобилиарной системы имеют повышенную свободнорадикальную активность, которая играет немаловажную роль в обеспечении адаптивных возможностей мозга.

Ключевые слова: патология печени, алкоголь, перекисное окисление липидов, водный лабиринт Морриса

Vakhnin V.A., Brukhin G.V.

The cognitive disorders and raised free-radical activity of a brain of posterity of rats-females with experimental chronic alcoholic pathology of a liver

South-Ural State medical university, 454092, Chelyabinsk, Russian Federation

It is established, that chronic alcoholic defeat of hepatobiliarity systems leads to infringement of cognitive functions at posterity. At the given group of animals revealed distress of memory and ability to orientation in space in the conditions of Morris water maze is, the research behavior is oppressed. Besides, the animals, born from mothers with chronic alcoholic defeat of hepatobiliarity systems have raised free-radical activity, which plays an important role in maintenance of adaptive possibilities of a brain.

Key words: liver disease, alcohol, degradation of lipids, Morris water maze

Проблема сохранения здоровья матери является приоритетной задачей нашего государства. Известно, что у матерей с хроническими поражениями гепатобилиарной системы рождается потомство с нарушением развития органов и функциональных систем, том числе и нервной системы [1, 2]. Хроническое употребление этанола особенно во время беременности проявляется серьезными тератогенными эффектами у потомства, что позволяет считать алкоголь одной из ведущих причин задержки умственного развития и врожденных уродств.

Цель исследования — анализ особенностей когнитивных функций у потомства самок крыс с экспериментальным алкогольным поражением печени.

Для корреспонденции: Вахнин Вячеслав Андреевич (Vakhnin Viacheslav Andreevich) — аспирант кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ГБОУ ВПО Челябинская государственная медицинская академия Минздрава Российской Федерации, e-mail: nash088@mail.ru

Методика

Эксперименты проведены на белых беспородных крысах-самках, у которых моделировалось хроническое алкогольное поражение печени с помощью 15% раствора этилового спирта, предлагаемого им для питья в течение трех месяцев [3]. По истечении этого времени к самкам подсаживали интактных самцов. С этого момента и в течение всей беременности животные алкоголь не получали. Повреждения печени у половозрелых самок крыс верифицировали на основании морфологических (некротические изменения дисккомплексация гепатоцитов, изменение соотношения строма—паренхима, гиперплазия печеночных макрофагов, расширение синусоидных капилляров, массивная лимфогистиоцитарная периваскулярная инфильтрация портальных трактов), иммунологических (высокий титр печеночных антител (1:320 и 1:640), биохимических (гипергаммаглобулинемия, увеличение АЛТ и АСТ, увеличение билирубина) исследований. Объектом исследования были 60-дневное потомство самок крыс с экспериментальным алко-

льным поражением печени (А-группа). Эту группу составили 10 крысят из 10 пометов интактных самок-крыс. Контрольную группу составили 10 крысят, взятых из 10 пометов (К-группа). Для оценки памяти и способности животных к ориентации в пространстве был использован водный лабиринт Морриса [4—6]. Водный лабиринт Морриса представлял собой бассейн диаметром 1,8 м и высотой стенок 60 см. Вода замутнялась водно-дисперсионной краской белого цвета. Для поддержания оптимальных условий тестирования животных температура воды в бассейне была относительно постоянной ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). Это достигалось системой термостатирования воды AQUAEL «Comfort Zone» (150 Вт). Вся поверхность лабиринта условно разделялась двумя взаимоперпендикулярными линиями на 4 сектора. Для облегчения ориентации животных внутри лабиринта каждый сектор маркировался отдельной геометрической фигурой.

Тестирование животных проводилось в течение 5 сут. В первые 4 сут. животных обучали нахождению скрытой подводной платформы. На 5-е сут. проводили контрольный тест без платформы. Каждому животному ежедневно предоставлялось по 4 попытки для нахождения скрытой платформы (по одной из каждого сектора). Время одной попытки составляло 90 с. Если животное за отведенное время не находило искомую платформу, то его принудительно сажали на нее и давали некоторое время для запоминания и ориентации внутри лабиринта (30 с), после чего снова начинали попытку до тех пор пока животное не найдет платформу. При этом местоположение скрытой под водой платформы диаметром 10 см оставалось постоянным (северный сектор), а последовательность секторов менялась для каждого дня. После каждой успешной попытки с какого-либо сектора лабиринта животным давали 1 мин отдыха на платформе, после чего продолжали процедуру тестирования. На 5-е сут. платформу убрали из воды, и фиксировали время пребывания животного в секторе, где ранее была платформа (в процентах от времени одной полной попытки — 90 с). Тем самым оценивали, насколько животное хорошо запомнило месторасположение платформы.

Передвижение животных в водном лабиринте регистрировали с помощью системы видеорегистрации Logitech HD Webcam C510 с последующим вычислением в программе WinTrack 32 следующих параметров: времени нахождения животным платформы (с), индекса извилистости маршрута при поиске платформы ($^\circ/\text{м}$), доли времени нахождения в секторе с платформой и в остальных секторах лабиринта ($\%$), доли времени нахождения животных в центральном секторе лабиринта ($\%$), а также среднего количества попыток, необходимых для нахождения искомой платформы. Полученные цифровые данные обрабатывали на компьютере с использованием про-

граммы SPSS Statistics v.17.0. Значимость полученных результатов определялась при помощи непараметрического критерия Манна—Уитни.

Поскольку нервные клетки нуждаются в потреблении большого количества кислорода, то для этой системы отмечена наиболее высокая уязвимость к свободнорадикальной атаке, ведущей к активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) [7]. Нами проведено определение уровня ПОЛ в головном мозге лабораторных животных. Для изучения содержания продуктов ПОЛ в головном мозге был избран экстракционно-спектрофотометрический метод с отдельной регистрацией продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта, поскольку данный метод позволяет оценить стабильность и «глубину» свободнорадикальной деструкции молекул, лежащих в основе нейрональных мембран [7].

Кроме того, нами производилось дополнительное определение конечных продуктов ПОЛ, в основе которых лежат шиффовые основания [8]. Измерения экстинкций проб проводили на спектрофотометре СФ-46 ЛОМО (СССР, 1988). Животных выводили из эксперимента путем декапитации, после чего готовили гомогенаты на 0,1% растворе ЭДТА в 0,9%-ном водном растворе NaCl из расчета 1,5 г сырой массы нервной ткани на 2,4 мл буфера [7].

Результаты и обсуждение

Установлено, что животные группы А характеризуются слабой исследовательской активностью, что подтверждается меньшим временем пребывания в центральном секторе лабиринта (рис. 1). Однако для животных этой группы характерна более высокая посещаемость данной области, что, скорее всего, отражает спонтанную тревожность, ведущую к большей двигательной активности и соответственно посещаемости всего лабиринта, нежели чем сосредоточенный поиск платформы.

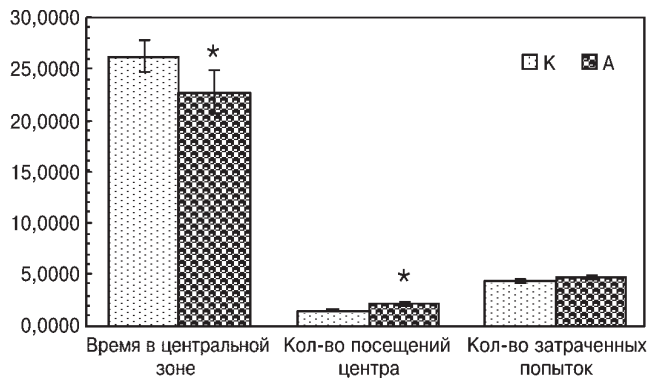


Рис. 1. Показатели исследовательской активности у животных экспериментальных групп на протяжении всего периода обучения; * — $p < 0,05$

Исследование извилистости пути движения лабораторных животных показало, что «алкогольным» животным свойственен меньший индекс извилистости маршрута, что указывает на низкую активность поиска платформы в лабиринте и может являться следствием нарушения памяти. Так, индекс извилистости пути у этих животных составил: 1-е сут. — $137,34 \pm 8,58$ °/м, 2-е сут. — $142,30 \pm 11,37$ °/м, 3- и 4-е сут. соответственно — $128,61 \pm 9,58$ и $137,75 \pm 9,82$ °/м. В контроле данный индекс составил: 1-е сут. — $138,99 \pm 8,16$ °/м, 2-е сут. — $136,93 \pm 9,58$ °/м, 3- и 4-е сут. — $144,08 \pm 8,87$ и $155,13 \pm 8,03$ °/м соответственно.

Другим важным критерием успешности обучения животных является время нахождения скрытой платформы (рис. 2). Установлено, что «алкогольные» животные тратили больше времени на поиск скрытой платформы на протяжении всех 4 сут. обучения в лабиринте. Кроме того, «алкогольные» животные характеризуются не только большим временем, тратящимся на обнаружение платформы, но и меньшим временем пребывания в ее секторе (рис. 3). Это сви-

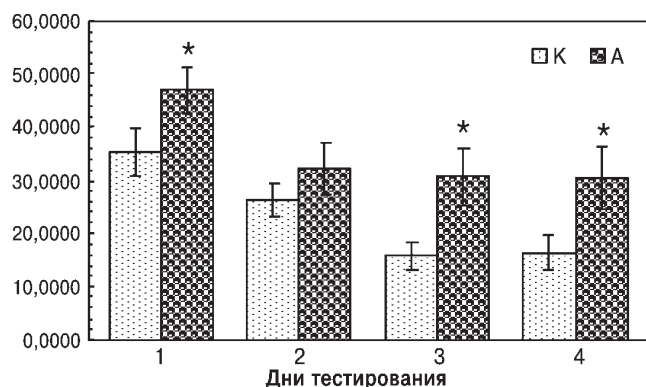


Рис. 2. Время нахождения экспериментальными животными скрытой платформы в водном лабиринте Морриса; * — $p < 0,05$

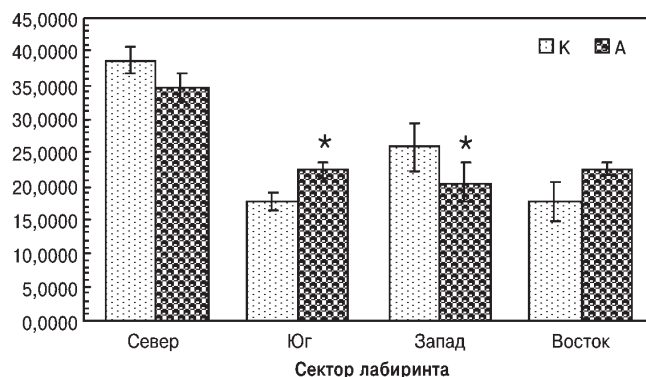


Рис. 3. Процент времени присутствия экспериментальных животных в секторе с платформой и других секторах лабиринта; * — $p < 0,05$

детельствует о нарушении памяти и ориентации в водном пространстве алкогольных животных [9]. Также на нарушение памяти у животных «алкогольной» группы указывает увеличение среднего количества попыток, необходимых для успешного поиска платформы (рис. 1).

Исследование экспериментальных животных в тесте Морриса на 5-е сут. обучения (тест без платформы) показало, что интактные животные быстрееплыли и исследовали область расположения платформы, не находя ее в условленном месте, они пытались найти ее в другом секторе лабиринта после чего, возвращались в тот сектор, где она ранее располагалась. «Алкогольные» животные дольше ($42,62 \pm 4,38\%$) находились в той области, где была платформа, чем контрольные ($36,94 \pm 1,93\%$). По-видимому, это связано с временем, которое интактные животные тратили на поиск платформы в других секторах лабиринта. Таким образом, исследование поведения «алкогольных» животных в водном лабиринте Морриса позволило выявить у них нарушения исследовательской активности, снижение памяти и ориентации в водном пространстве.

Результаты исследования ПОЛ в головном мозге экспериментальных животных представлены в таблице. Как видно из таблицы, животные алкогольной группы характеризуются более низкими индексами первичных (E232/E220) и вторичных (E278/E220) продуктов окисления водно-спиртовой (изопропиловой) фазы липидного экстракта. Известно, что эта фаза отражает уровень окисления структурных липидов (фосфолипидов) клеточных мембран [7]. Это может свидетельствовать о формировании у «алкогольных» животных общего адаптационного синдрома [7]. Низкие индексы первичных и вторичных продуктов окисления указывают на повышенное содержание общих полиеновых продуктов окисления (E220) животных опытной группы. Это может указывать на нарушение функции антиоксидантных систем, обеспечивающих защиту организма от повреждающего действия гидроперекисей [10].

Исследование гептановой фазы показало, что «алкогольные» животные характеризуются более высокими индексами первичных (E232/E220), вторичных (E278/E220) и конечных (E400/E220) продуктов окисления (таблица). Известно, что данная фаза отражает уровень окисления резервных липидов клетки (триацилглицеридов) [7]. Повышение индексов окисления гептановой фазы свидетельствует об ослаблении регенераторных процессов в нейрональных мембранах в ходе повреждения свободными радикалами. Понижение индексов окисления первичных и вторичных продуктов изопропиловой фазы у «алкогольных» животных, скорее всего, говорит о развитии

Содержание продуктов перекисного окисления липидов в головном мозге экспериментальных животных

Группа	Гептановая фаза			Изопропиловая фаза		
	E232/E220	E278/E220	E400/E220	E232/E220	E278/E220	E400/E220
К	0,550 ± 0,023	0,212 ± 0,019	0,026 ± 0,008	0,708 ± 0,020	0,367 ± 0,001	0,080 ± 0,019
А	0,645 ± 0,026*	0,249 ± 0,026	0,032 ± 0,005	0,687 ± 0,013*	0,348 ± 0,011*	0,089 ± 0,017

Примечание. * — $p < 0,05$

общего адаптационного синдрома [7], поскольку индекс окисления конечных продуктов был выше, чем в контроле. Главным патогенетическим механизмом является повышенная продукция активных форм кислорода, а также низкая антиоксидантная активность нервных клеток. По-видимому, у «алкогольных» животных отмечается недостаток выработки ферментов антиоксидантной защиты, что позволяет свободным радикалам проявлять выраженное цитоповреждающее действие.

Таким образом, результаты исследования в головном мозге экспериментальных животных показывают, что «алкогольные» животные более подвержены окислительному стрессу (индексы окисления продуктов гептановой фазы, индекс окисления конечных продуктов изопропиловой фазы) и появлению общего адаптационного синдрома (индексы окисления первичных и вторичных продуктов изопропиловой фазы). Эти данные согласуются с результатами, полученными в тесте Морриса: снижение у «алкогольных» животных исследовательской активности (время в центральной части бассейна), снижение памяти и ориентации в пространстве (время нахождения платформы, время в секторе с платформой, среднее количество попыток, необходимых для нахождения платформы). Полученные результаты позволяют сделать заключение, что у животных с хроническим алкогольным поражением гепатобилиарной системы рождается потомство с нарушением когнитивных функций, протекающим на фоне увеличения свободнорадикальной активности мозга.

В целом, проведенные исследования позволяют теоретически обосновать необходимость выделения детей от матерей с хронической патологией гепатобилиарной системы в группы риска по умственному и психическому развитию.

Список литературы

1. Брюхин Г.В., Сизоненко М.Л. Роль экспериментального поражения печени матери в развитии физиологической незрелости потомства. *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2012; 154 (11): 544–547.
2. Кузнецова А.Б., Брюхин Г.В. Влияние хронического алкогольного поражения самок крыс на структур-

но-функциональное становление нейросекреторных клеток супраоптического ядра потомства. *Вестник ЮрГУ.* 2008; 104 (4): 29–30.

3. Буров Ю.В., Ведерникова Н.Н., Игнатов В.Я., Иваненко Т.И. Изменение гонадотропной функции гипофиза крыс при развитии экспериментального алкоголизма. *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 1986; 12 (6): 675–6.

4. Ватаева Л.А., Тюлькова Е.И., Хожай Л.И., Самойлов М.О., Отеллин В.А. Обучение в водном лабиринте Морриса самок и самцов крыс, подвергавшихся воздействию гипоксии в различные сроки пренатального периода развития. *Ж. эвол. биохим. и физиол.* 2005; 41 (6): 530–3.

5. Плескачева М.Г., Зорина З.А., Николенко Д.Л., Вольфер Д.П., Костына З.А., Липп Х.П. Поведение в водном тесте Морриса крыс линии Крушинского—Молодкиной, селектированных на повышенную судорожную готовность. *Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова.* 2002; 52 (3): 356–65.

6. Buccafusco J. *Methods of behavior analysis in neuroscience.* Theoretical and practical considerations for the evaluation of learning and memory in mice. Washington; 2001.

7. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л., Цейликман В.Э. *Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма.* Челябинск; 2000.

8. Львовская Е.И., Волчегорский И.А., Шемяков С.Е., Лифшиц Р.И. Спектрофотометрическое определение конечных продуктов перекисного окисления липидов. *Вопр. мед. химии.* 1991; 37 (4): 92–3.

9. Вахнин В.А., Брюхин Г.В. Особенности формирования пространственной ориентации у потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени в водном лабиринте Морриса. *Рос. физиол. журн.* 2013; 99 (4): 464–70.

10. Дюмаев К.М., Воронина Т.А., Смирнов Л.Д. *Антиоксиданты в профилактике и терапии патологий ЦНС.* М.; 1995.

References

1. Brukhin G.V., Sizonenko M.L. Role of experimental injury of a liver of mother in development of physiological immaturity of posterity. 2012; 154 (11): 544–7. (in Russian)
2. Kuznetsova A.B., Brukhin G.V. Influence of chronic alcoholic injury of females of rats on structurally-functional formation of neurosecretory cells of supranucleus of posterity. *Bulletin of South-Ural State University.* 2008; 104 (4): 29–30. (in Russian)
3. Burov U.V., Vedernikova N.N., Ignatov V.Y., Ivanenko T.I. Change of gonadotrophic function of a hypophysis of rats at development of an experimental

alcoholism. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1986; 12 (6): 675—6. (in Russian)

4. Vataeva L.A., Tyul'kova E.I., Khozhai L.I., Samoilov M.O., Otellin V.A. Training in the Morris water maze of female and male rats exposed to hypoxia at various periods of prenatal development. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2005; 41 (6): 530—3. (in Russian)

5. Pleskacheva M.G., Zorina Z.A., Nikolenko D.L., Volfer D.P., Kostyna Z.A., Lipp H.P. Behaviour of Krushinsky—Molodkina rats in Morris water maze, selected on the raised convulsive readiness. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2002; 52 (3): 356—65. (in Russian)

6. Buccafusco J. *Methods of behavior analysis in neuroscience*. Theoretical and practical considerations for the evaluation of learning and memory in mice. Washington; 2001.

7. Volchegorsky I.A., Dolgushin I.I., Kolesnikov O.L., Tseylikman V.E. Experimental modelling and laboratory es-

timation of adaptive reactions of an organism. Chelyabinsk; 2000. (in Russian)

8. Lvovskaya E.I., Volchegorsky I.A., Shemyakov S.E., Lifshits R.I. Spectrophotometric definition of end-products of oxidative degradation of lipids. *Vopr. Med. Khim.* 1991; 37 (4): 92—3. (in Russian)

9. Vakhnin V.A., Brukhin G.V. Features of spatial orientation formation in posterity of female of rats with liver experimental injury in Morris water maze. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2013; 99 (4): 464—70. (in Russian)

10. Dumaev K.M., Voronina T.A., Smirnov L.D. *Antioxidants in preventive maintenance and therapy of pathologies of CNS*. Moscow; 1995.

Поступила 12.07.13

Received 12.07.13

Сведения об авторах:

Брюхин Геннадий Васильевич (Brukhin Gennady Vasil'evich) — д.м.н., профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, ГБОУ ВПО Челябинская государственная медицинская академия Минздрава Российской Федерации, e-mail: kanc@chelsma.ru

Житков М.Ю., Орлов А.А.

Влияние ионов кальция и фосфата на скорость адсорбции щелочной фосфатазы и некоторых белков из сыворотки крови на гидроксиапатите

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

Избирательная адсорбция щелочной фосфатазы (ЩФ) на гидроксиапатите (ГАП) ускоряется ионами фосфата и тормозится ионами кальция. Поскольку биологическая функция ЩФ состоит в синтезе фосфат ионов из органических фосфатов, активность фермента способствует его адсорбции в минерализованных тканях на ГАП, что можно связать с особенностями действия адсорбированного фермента по сравнению с растворенным. По-видимому, избирательная сорбция сигнальных молекул и ферментов в межклеточном матриксе создает необходимое для дифференцировки и функционирования клеток тканей микроокружение. Состав сорбата определяет тип дифференцировки клеток, который, в свою очередь, определяет свойства синтезируемого ими матрикса. Этим замыкается петля обратной связи, поддерживающей гомеостаз тканей. Полученные результаты могут быть использованы при разработке биомиметических материалов для медицины, а также при создании многослойных покрытий с заданными свойствами путем регулируемого по скорости избирательного осаждения коллоидных частиц (наночастиц). В случае анизотропных частиц возможно получение слоев не только частиц одного типа, но и с заданной их ориентацией в каждом слое путем создания частиц с локализованными участками связывания с сорбентом.

Ключевые слова: щелочная фосфатаза, гидроксиапатит, адсорбция, минерализация, коллоиды

Zhitkov M.Yu., Orlov A.A.

Influence of calcium and phosphate ions on the adsorption rate of alkaline phosphatase and some of serum proteins on the hydroxyapatite

Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS (NIIOPP RAMS), 125315, Moscow, Baltiyskaya str., 8

Calcium ions accelerate selective adsorption of AP on HAP and phosphate ions inhibit it. Since the biological function of AP is in the synthesis of phosphate ions from organic phosphates, enzyme activity contributes to its adsorption on mineralized tissues HAP, which can be associated with the peculiarities of the action of the enzyme adsorbed compared with dissolved. Apparently, the selective adsorption of enzymes and signaling molecules in the extracellular matrix to produce the microenvironment necessary for cell differentiation and function of tissue. Sorbate composition determines the type of cell differentiation, which, in turn, determines the properties of the synthesized matrix. Thereby circuiting occurs a feedback loop, to maintain homeostasis of tissues. These results can be used to develop a biomimetic material for medicine as well as the fabrication of multilayer coatings with desired properties by means of controlled speed by selectively depositing colloidal particles (nanoparticles). In the case of anisotropic particles the layers it is possible to obtain particles not only one type, but also with their desired orientation in each layer of particles by creating localized sorbent binding sites.

Key words: alkaline phosphatase, hydroxyapatite adsorption, mineralization, colloids

В синтезе минерального компонента костной ткани, основную массу которого составляют кальций-фосфатные гидроксиапатит (ГАП) и карбонатапатит ключевую роль играет фермент щелочная фосфатаза (ЩФ). В этом процессе ЩФ участвует как в растворе, так и будучи адсорбированной на мине-

ральной фазе [1, 2]. Апатиты способны адсорбировать широкий круг биологически активных веществ [3], роль этого явления в биохимии костной ткани изучена недостаточно.

Кислые белки с $pI < 7$, к которым относится и сывороточная ЩФ [4], адсорбируются на ГАП за счет карбоксильных групп аспарагината и глутамата, имеющих кислый характер [3, 5, 6, 7]. Однако ЩФ вероятно взаимодействует с ГАП участками, богатыми аминокислотными группами [1]. При адсорбции вещества по

Для корреспонденции: Житков Михаил Юрьевич (Zhitkov Michail Yur'evich), к.б.н., и.о. ведущего научного сотрудника лаборатории клеточной биологии и патологии развития, e-mail: hongma@yandex.ru

ионному механизму, ее скорость будет зависеть от потенциала двойного электрического слоя поверхности сорбента. Этот потенциал в значительной степени определяется специфически сорбирующимися ионами, которыми в случае ГАП являются, в частности, ионы кальция и фосфата [8]. Избыток ионов кальция придает поверхности ГАП положительный заряд и усиливает сорбцию кислых белков, а при избытке фосфата заряд будет отрицательным и сильнее сорбируются будут основные белки [3, 6]. Соответственно, измеряя скорость адсорбции различных белков на ГАП при избытке в растворе ионов кальция или фосфата можно определить механизм адсорбции этого белка.

Цель исследования — определение механизма адсорбции ЦФ сыворотки крови человека на ГАП путем исследования влияния концентрации ионов кальция и фосфата в этой биожидкости на скорость адсорбции содержащихся в ней ЦФ и других белков на ГАП.

Методика

В работе использовали бидистиллированную воду, полученную в кварцевом перегонном аппарате; ГАП и другие реактивы — производства фирмы Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Германия; наборы реактивов для определения общего белка (ОБ) биуретовым методом, кальция с арсеназо III, фосфата с молибдатом и ЦФ по скорости гидролиза п-нитрофенилфосфата в диэтиламинном буфере — производства фирмы BioSystems, Испания; пластиковая посуда — производства фирмы Erpendorf AG, Германия. Сыворотку получали из крови пациентов (32 чел.), сдавших кровь для обследования перед плановыми операциями в хирургических отделениях ФГБУ «ЦНИИС и ЧЛХ» МЗ РФ. Определения проводили на биохимическом анализаторе BTS-370 (BioSystems, Испания).

Сыворотку крови, объединенную в единый пул, разделили на 3 равные части. В первую (1-я серия) вносили 0,5 М раствор хлорид кальция, (рН последнего был доведен добавлением 5% NaOH до значения 7,2), до концентрации 5 мМ Ca^{+2} . Во вторую (2-я серия) — 1 М натрий-фосфатный буфер (рН = 7,2) до концентрации фосфата 10 мМ. В третью (3-я серия) — 0,9%-ный раствор хлорида натрия в количестве 1/100 от объема сыворотки.

Навески ГАП по 40 мг в пластиковых пробирках уравнивали 5 сут. при 37°C в растворах 5 мМ хлорида кальция (1-я серия) или 10 мМ натрий-фосфатного буфера (рН = 7,2) (2-я серия) или 0,9%-ный хлорид натрия (3-я серия), взятых в объемах 1,5 мл. Растворы ежедневно заменяли свежими.

Во всех случаях разделение ГАП и жидкости проводили центрифугированием 10 мин при 3000 об./мин. Затем ГАП дважды промывали водой (по 2,0 мл) воды и высушивали при 37°C до воздушно-сухого состояния. Пробирки с навесками ГАП подогревали до 37°C и добавляли в них по 0,5 мл сыворотки соответствующей серии, подогретой до этой же температуры. После инкубации при 37°C в течение 2, 15, 150 и 330 мин, ГАП отделяли центрифугированием и в супернатанте определяли содержание ОБ, ЦФ, кальция (Ca) и фосфата. В каждой серии проводили по 5 определений в каждой временной точке. Для каждой серии рассчитывали константу скорости адсорбции ОБ и ЦФ, среднюю концентрацию Ca и фосфата. Для каждой величины рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение. Значимость отклонения от нормального распределения оценивали по показателям асимметрии и эксцесса. Поскольку абсолютные величины этих показателей не превышали их ошибки репрезентативности, распределения определяемых величин можно считать нормальными. Значимость различий оценивали по критерию Стьюдента. Кроме того, рассчитывали коэффициенты корреляции констант скорости и концентраций ионов.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования приведены в табл. 1 и 2.

Приведенные в табл. 1 и 2 значения константы скорости адсорбции на ГАП общего белка и соответствующих коэффициентов корреляции указывают, что в исследованном интервале концентраций Ca и фосфата скорость адсорбции ОБ практически постоянна: различия между сериями незначимы ($p \geq 0,05$) и коэффициенты корреляции невелики. Константа скорости адсорбции ЦФ напротив, сильно зависит от концентраций ионов Ca и фосфата, причем их влияние противоположно. Во всех случаях константы скорости для ЦФ существенно выше, чем для ОБ, уровень значимости различий: $p < 0,01$. Наблюдается торможение адсорбции ЦФ на ГАП под влиянием ионов Ca и ускорение — ионов фосфата (для серий 1 и 2: $p < 0,001$). Это указывает на ионный механизм адсорбции ЦФ на ГАП [8]: участок связывания содержит положительно заряженные группы (аминогруппы), взаимодействующие с отрицательно заряженной поверхностью ГАП, что противоположно механизму, обычно наблюдаемому для кислых белков [5].

ОБ сыворотки крови представляет собой сложную смесь различных по свойствам белков, кинетика взаимодействия которых с ГАП отражает в усредненном виде неспецифические механизмы адсорбции [3, 5—7]. Ранее нами было показано, что скорость ад-

Таблица 1

Средние концентрации ионов кальция и фосфата и константы скорости адсорбции ОБ и ЩФ ($M \pm \sigma$)

	Ca, mM	Фосфат, mM	Константа скорости для:	
			ОБ, $k \times 10^{-6}, c^{-1}$	ЩФ, $k \times 10^{-6}, c^{-1}$
Серия 1 (n = 5)	5,27 ± 0,81	0,27 ± 0,10	5,15 ± 3,20	15,1 ± 5,0
Серия 2 (n = 5)	0,23 ± 0,08	10,2 ± 2,0	5,01 ± 3,11	82,6 ± 9,5
Серия 3 (n = 5)	2,12 ± 0,20	1,24 ± 0,17	4,14 ± 2,03	68,3 ± 8,8

Таблица 2

Коэффициенты корреляции констант скоростей адсорбции ОБ и ЩФ и концентраций ионов кальция и фосфата

	Коэффициенты корреляции с концентрациями ионов	
	Кальций	Фосфат
Константа скорости для ОБ	0,27	0,30
Константа скорости для ЩФ	-0,98	0,73

сорбции белков сыворотки крови по неспецифическим механизмам на порядок ниже, чем для ЩФ. При этом адсорбция молекул ЩФ на ГАП сопровождается их ориентацией относительно поверхности ГАП [1], что можно связать с необходимостью предотвращения экранирования активного центра фермента поверхностью сорбента.

Полученные результаты показывают, что изменение состава жидкой фазы модулирует адсорбцию одного из компонентов биожидкостей (ЩФ) на структурах межклеточного матрикса.

Как мы указывали ранее, здесь мы имеем дело с частным проявлением общей закономерности: избирательная сорбция сигнальных молекул и ферментов в межклеточном матриксе создает необходимое для дифференцировки и функционирования клеток тканей микроокружение, состав сорбата определяет тип дифференцировки, который, в свою очередь, определяет свойства синтезируемого клетками матрикса. Тем самым происходит замыкание петли обратной связи, поддерживающей гомеостаз тканей [1].

Создание имплантатов с поверхностями, имитирующими сорбционные свойства межклеточного матрикса определенных тканей, открывает новые возможности управляемой гистокондукции и гистоиндукции.

Полученные результаты могут быть использованы при разработке биомиметических материалов для медицины, а также при создании многослойных покрытий с заданными свойствами путем регулируемого по скорости избирательного осаждения коллоидных частиц (наночастиц). В случае анизотропных частиц возможно получение слоев не только частиц одного типа, но и с заданной их ориентацией в каждом слое путем создания частиц с локализованными участками связывания с сорбентом. При наличии нескольких

подобных участков с различными механизмами связывания путем изменения условий можно добиться различной ориентации частиц одного вида в разных слоях. Кроме того, исследование механизмов адсорбции биомолекул на различных поверхностях необходимо для разработки избирательных сорбентов для гемодиализа и аналитических целей [9].

Список литературы

1. Житков М.Ю. *Механизмы иммобилизации ферментов на эмали зубов и их действия в полости рта*. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. ЦНИИ стоматологии Министерства здравоохранения Российской Федерации. Москва, 2000, 22 с.
2. Леонтьев В.К., Алексина О.А., Веселова М.Н., Полторак О.М., Чухрай Е.С. Иммобилизация ферментов на эмали зубов и их вероятная роль в физиологии и патологии полости рта. *Стоматология*. 1992; 71 (2): 6–7.
3. Скоупс Р. *Методы очистки белка*: Пер. с англ. М.: Мир; 1985.
4. McComb R.B., Bowers G.H., Posen S. *Alkaline phosphatase*. New York and London: Plenum Press, 1979.
5. Gorbunoff M.J. The interaction of proteins with hydroxyapatite: I. Role of protein charge and structure. *Analytical Biochemistry*. 1984; 136 (Issue 2): 425–32.
6. Gorbunoff M.J. The interaction of proteins with hydroxyapatite: II. Role of acidic and basic groups. *Analytical Biochemistry*. 1984; 136 (Issue 2): 433–39.
7. Gorbunoff M.J., Timasheff S.N. The interaction of proteins with hydroxyapatite: III. Mechanism. *Analytical Biochemistry*. 1984; 136 (Issue 2): 440–45.
8. Goldberg S. *Adsorption models incorporated into chemical equilibrium models*. Chemical equilibrium and reaction models, SSSA Special Publication: 42–95.
9. Архипова Е.Н., Дедаев С.И., Алчинова И.Б., Черепов А.Б., Goldenberg L., Карганов М.Ю. Исследование взаимодействия наночастиц диоксида титана и сыворотки крови больных аутоиммунными заболеваниями. *Патогенез*. 2011; 9(1): 67–70.

References

1. Zhitkov M.Yu. *Mechanisms of enzymes immobilizing on the enamel of the teeth and their operations in the oral cavity*. Diss. Moscow; 2000, 22 c. (in Russian)
2. Leont'ev V.K., Alexina O.A., Veselov M.N., Poltorak O.M., Chukhray E.S. Immobilization of enzymes on the tooth enamel and their probable role in the physiology and pathology of the oral cavity. *Stomatologiya*. 1992; 71 (2): 6–7. (in Russian)
3. Scopes R. *Methods for protein purification*: Translate from English. M.: Mir; 1985. (in Russian)
4. McComb R.B., Bowers G.H., Posen S. *Alkaline phosphatase*. New York and London: Plenum Press, 1979.
5. Gorbunoff M.J. The interaction of proteins with hydroxyapatite: I. Role of protein charge and structure. *Analytical Biochemistry*. 1984; 136 (Issue 2): 425–32.
6. Gorbunoff M.J. The interaction of proteins with hydroxyapatite: II. Role of acidic and basic groups. *Analytical Biochemistry*. 1984; 136 (Issue 2): 433–39.
7. Gorbunoff M. J., Timasheff S.N. The interaction of proteins with hydroxyapatite: III. Mechanism. *Analytical Biochemistry*. 1984; 136 (Issue 2): 440–45.
8. Goldberg S. *Adsorption models incorporated into chemical equilibrium models*. Chemical equilibrium and reaction models, SSSA Special Publication: 42–95.
9. Arkhipova E.N., Dedaev S.I., Alchinova I.B., Cherepov A.B., Goldenberg L., Karganov M.Yu. Study of interaction of titanium dioxide nanoparticles and blood serum of patients with autoimmune diseases. *Pathogenesis*. 2011; 9(1): 67–70. (In Russian)

Поступила (Received) 17.06.14

Сведения об авторах:

Орлов Андрей Александрович (Orlov Andrey Aleksandrovich) — e-mail: doctororlov@gmail.com

Теблочева Л.М., Гуревич К.Г.

Остеоиммунология и пародонтит

Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, 127473, Москва, ул. Делегатская, 20, стр. 1

Пародонтит — это патологическое состояние, которое включает в себя воспалительный процесс опорно-удерживающих структур зуба. Многочисленные исследования указывают на то, что гипериммунные ответы на пародонтопатогенные микроорганизмы приводят к разрушению соединительной ткани и альвеолярной кости. В данном обзоре мы рассмотрим некоторые аспекты иммуно-воспалительного ответа, что в конечном итоге приводит к стимуляции остеокластогенеза.

Ключевые слова: заболевания пародонта, цитокины, остеоиммунология

Tebloeva L.M., Gurevich K.G.

Osteoimmunology and Periodontitis

Moscow State Medical Dental University A.I. Evdokimov, Health Ministry, 127473, Moscow, Delegatskaya, 20, 1

Periodontal disease is a pathological condition that involves inflammation of the tooth supporting structures. Accumulated lines of evidence suggest that hyperimmune responses to periodontal bacteria result in the destruction of periodontal connective tissue and alveolar bone. In this review, we discuss several aspects of the immune-inflammatory host response that ultimately results in loss of alveolar bone and stimulates osteoclastogenesis.

Key words: periodontal disease, cytokine, osteoimmunology

Пародонтит — это воспалительный процесс, который затрагивает 90% населения и, повреждая ткани зубов, приводит в конечном итоге к их выпадению [1]. Инфекционный процесс начинается на уровне эпителия десны и, прогрессируя при определённых условиях, вовлекает в процесс весь опорно-удерживающий аппарат зуба.

Заболевания пародонта увеличивают риск развития сердечно-сосудистых заболеваний и очень тесно связаны с такими хроническими заболеваниями, как сахарный диабет, метаболический синдром, ревматоидный артрит и др. [2, 3—6].

В последние два десятилетия учёные сосредоточились на роли бактериальной инфекции, проявляя интерес к «хост» ответу как к наиболее значимому фактору развития пародонтита. На сегодняшний день есть отчетливое подтверждение того, что при пародонтите в патологический процесс вовлекаются как врождённый, так и приобретённый иммунные ответы [7—8].

Первичная местная реакция на бактериальную инфекцию активирует врождённый иммунитет, вырабатывая большое количество цитокинов и медиаторов воспаления, которые приводят к разрушению соединительной ткани и альвеолярного отростка челюсти, что указывает на развитие пародонтита [9].

Воспаление развивается через 2—4 сут. после скопления налёта в десневой борозде. На этом этапе происходит повышение гидростатического давления в микроциркуляторном русле, что приводит к повышенной проницаемости сосудов [9, 10]. Поскольку сохраняется воздействие микроорганизмов, воспалительный ответ продолжает нарастать, усиливается инфильтрация лейкоцитами соединительной ткани, происходит выраженная деструкция коллагеновых волокон. Пародонтальный карман за счёт роста биоплёнки в анаэробной среде углубляется [11—12]. Этот процесс приводит к повреждению тканей пародонта.

Предполагается, что развитие заболевания связано с сочетанием нескольких факторов: наличием пародонтопатогенных микроорганизмов, высоким уровнем провоспалительных цитокинов, матричных металлопротеиназ (ММП), низким уровнем IL-10 [13].

Согласно этой концепции, баланс цитокинов определяет, происходит ли разрушение тканей пародонта или поддерживается гомеостаз.

Роль пародонтопатогенных микроорганизмов в определении прогрессирования данного заболевания является весьма сложной. Пародонтит не связан с наличием одного определённого микроорганизма, а включает в себя широкий спектр пародонтопатогенов.

Многочисленные работы, связанные с изучением состава биоплёнки у пациентов с пародонтитом, показали, что заболевания пародонта связано с более высоким содержанием анаэробных грамотрицательных микроорганизмов, таких, как *Prevotella*, *Leptotrichia*, *Veillonella*, *Porphyromonas*, *Treponema*. Данные микроорганизмы разрушают ткани пародонта непосредственно через такие патогенные продукты, как эндотоксины, коллагеназы, вызывая иммунный ответ [14].

Первым неоспоримым доказательством того, что «хост» ответ играет важную роль в развитии пародонтита в 1985 г. было продемонстрировано на гончих собаках учёными R.C. Williams, M.K. Jeffcoat, M.L. Kaplan, которые, используя мощный ингиби-

тор циклооксигеназы, сократили потерю костной ткани [15].

В 1998 г. D.T. Graves, A.J. Delima, R. Assuma показали, что ингибирование IL-1 и TNF- α снижает количество моноцитов и лимфоцитов, что приводит к снижению резорбции костной ткани [16, 17].

Работы последних лет подтвердили гипотезу о том, что цитокины являются неотъемлемой частью развития заболеваний пародонта.

Одним из важнейших компонентов «хост» ответа являются Toll-Like Receptors (TLRs), играющие роль в первичном обнаружении микроорганизмов на слизистой оболочке полости рта. Активация последних приводит к продуцированию каскада цитокинов, многие из которых прямо или косвенно стимулируют образование остеокластов [18].

Цель исследования — определение содержания цитокинов в десневой жидкости и сыворотке крови у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом.

Методика

Исследования проведены на 147 пациентах в возрасте от 35—50 лет, страдающих заболеваниями пародонта.

В сыворотке периферической крови и десневой жидкости определяли содержание следующих цитокинов: TNF- α , IFN- γ , IL-17, IL-18, IL-4, IL-10, sRANKL и OPG. Исследования проводили методом твердофазного ИФА с помощью соответствующих коммерческих тест-систем («Вектор-Бест», Россия). До начала исследования образцы транспортировали в изотермических условиях при температуре 18—23°C.

Анализ содержания цитокинов IFN- γ , IFN- α , IL-4, IL-10 и TNF- α проводили с помощью коммерческих наборов производства компании «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург, РФ) для постановки твердофазного иммуноферментного анализа.

Результаты и обсуждение

Содержание цитокинов в десневой жидкости пародонтальных каналов у пациентов к ХГП

Результаты исследований провоспалительных цитокинов TNF- α , IFN- γ , IL-18, IL-17, представленные на рис. 1, показали, что наибольший уровень в десневой жидкости определяется по содержанию TNF- α , который достигает $268 \pm 37,16$ пкг/мл и превосходит таковой у практически здоровых лиц более чем в 7 раз.

Содержание же других провоспалительных цитокинов — IL-18, IL-17 и IFN- γ в десневой жидкости больных ХГП выше, чем у контрольных лиц, в 2—1,6 раза соответственно.

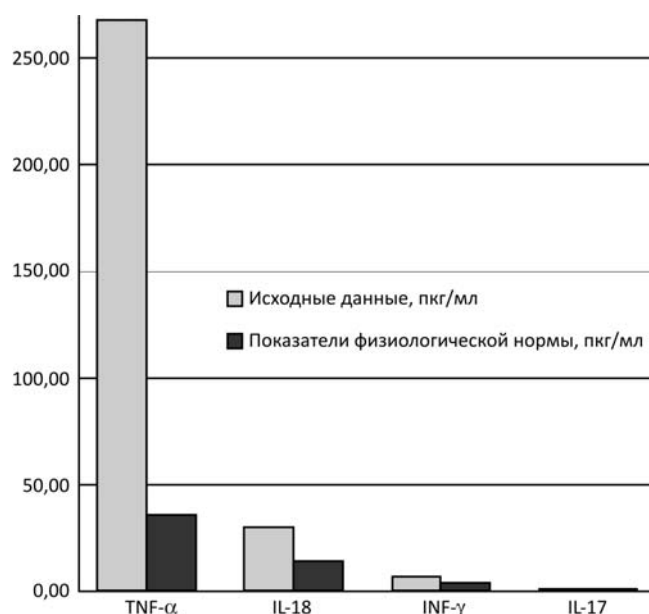


Рис. 1. Содержание провоспалительных цитокинов в десневой жидкости пародонтальных карманов пациентов с хроническим пародонтитом (n = 147).

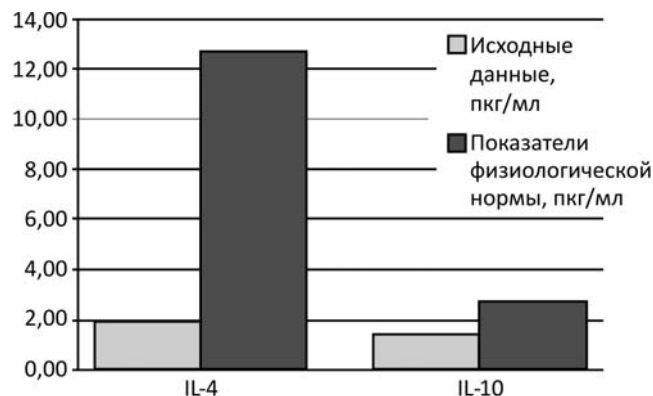


Рис. 2. Содержание провоспалительных цитокинов в десневой жидкости пародонтальных карманов пациентов с хроническим пародонтитом (n = 147).

Наряду с этим содержание противовоспалительного цитокина — IL-4 в десневой жидкости ХП составило $1,92 \pm 1,3$ пкг/мл, что более чем в 6,6 раза ниже, чем у практически здоровых лиц, содержание IL-10 определяется на уровне $1,36 \pm 0,92$ пкг/мл, что в 2 раза ниже его содержания в десневой жидкости контрольных лиц (рис. 2).

В десневой жидкости пародонтального кармана пациентов ХГП определялось также повышенное содержание цитокинов sRANKL и OPG, непосредственно участвующих в остеокластогенезе, которое составило $15,2 \pm 2,3$ пкг/мл и $7,5 \pm 0,3$ пкг/мл, что почти в 5 раз и в 2 раза соответственно выше этих показателей у практически здоровых людей (рис. 3).

Вместе с тем, индекс соотношения sRANKL/OPG больных ХП в десневой жидкости в 2 раза выше (2,02), чем у лиц контрольной группы (0,95).

Таким образом, в десневой жидкости больных ХП повышено содержание провоспалительных цитокинов в последовательности $\text{TNF-}\alpha > \text{IL-18} > \text{IL-17} > \text{IFN-}\gamma$ и снижено относительно нормы содержание противовоспалительных цитокинов в последовательности $\text{IL-4} < \text{IL-10}$.

Кроме того, между содержанием в десневой жидкости больных ХП $\text{TNF-}\alpha$ ($268 \pm 37,16$ пкг/мл) и IL-4 ($1,92 \pm 1,3$ пкг/мл) прослеживается обратно пропорциональная зависимость с коэффициентом в 139,5 по сравнению с практически здоровыми ($\text{TNF-}\alpha = 36,3 \pm 2,95$, IL-4 = $12,7 = 3,2$ пкг/мл) у которых этот коэффициент составляет только 2,8.

Индекс соотношения цитокинов, определяющих остеокластогенез sRANKL/OPG у больных ХГП ($15,2 \pm 2,3$ пкг/мл и $7,5 \pm 0,3$ пкг/мл соответственно) превосходит таковой в норме ($3,15 \pm 0,5$ пкг/мл и $3,3 \pm 0,85$ пкг/мл соответственно) в 2 раза.

Содержание цитокинов в сыворотке крови больных хроническим генерализованным пародонтитом (ХГП)

Результаты исследований представленные на рис. 4 и 5 показали, что наибольший уровень в сыворотке крови больных ХП определяется по содержанию $\text{TNF-}\alpha$ и IL-17, которое превышает таковое у практически здоровых в 10 и 8,5 раз и составляют $5,0 \pm 1,2$ пкг/мл и $17,1 \pm 2,3$ пкг/мл соответственно.

Содержание IFN- γ и IL-18 составляло $2,92 \pm 2,3$, 293 пкг/мл и $76 \pm 80, 75$ пкг/мл соответственно, что выше, чем у контрольных лиц, в 1,83 раза.

Уровень противовоспалительных цитокинов IL-4 и IL-10 в сыворотке крови больных ХГП был ниже, чем у практически здоровых в 2,7 и в 1,9 раза и со-

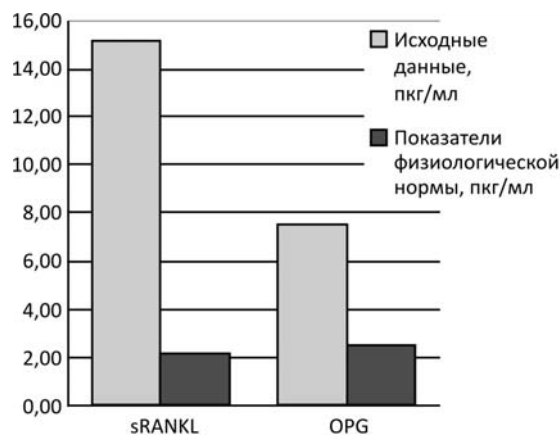


Рис. 3. Содержание цитокинов остеокластогенеза в десневой жидкости пародонтальных карманов пациентов с хроническим пародонтитом (n = 147).

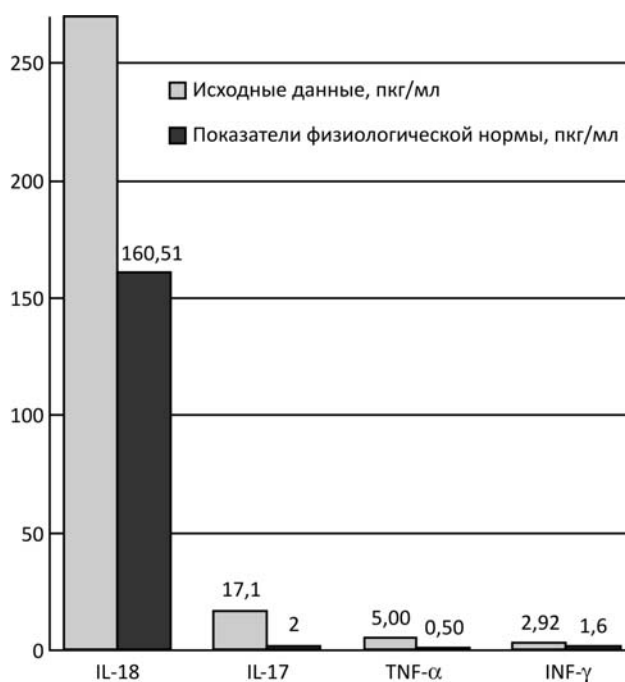


Рис. 4. Содержание провоспалительных цитокинов в сыворотке крови пациентов с хроническим пародонтитом (n = 147).

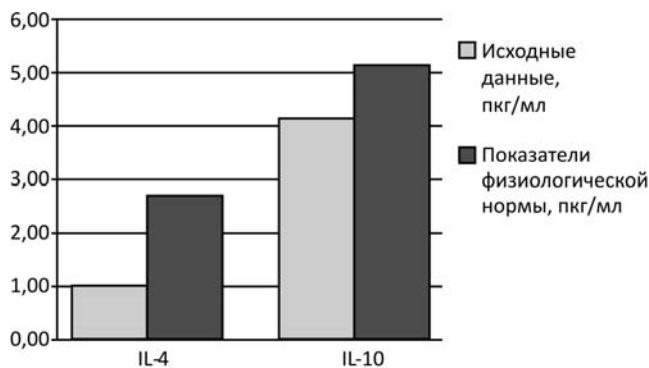


Рис. 5. Содержание провоспалительных цитокинов в сыворотке крови пациентов с хроническим пародонтитом (n = 147).

ставил $1,00 \pm 0,85$ пкг/мл и $4,14 \pm 1,09$ пкг/мл соответственно (рис. 5).

Таким образом, в сыворотке крови больных ХП определяется повышением относительно физиологической нормы уровня провоспалительных цитокинов в последовательности: $TNF-\alpha > IL-17 > IL-18 > IFN-\gamma$ и снижение содержания противовоспалительных цитокинов относительно контроля $IL-4 < IL-10$.

Кроме того, между содержанием в сыворотке крови больных ХГП $TNF-\alpha$ ($5,0 \pm 1,2$ пкг/мл) и $IL-4$

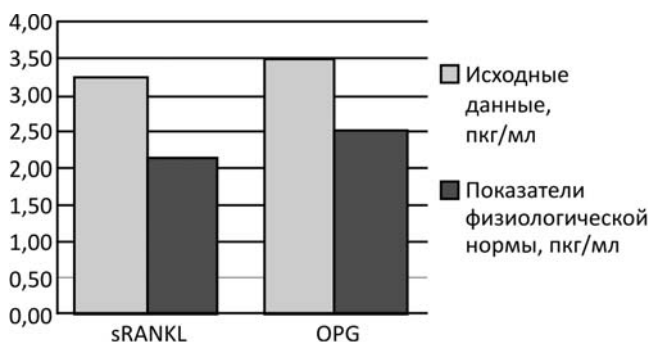


Рис. 6. Содержание цитокинов остеокластогенеза в сыворотке крови пациентов с хроническим пародонтитом ($n = 147$).

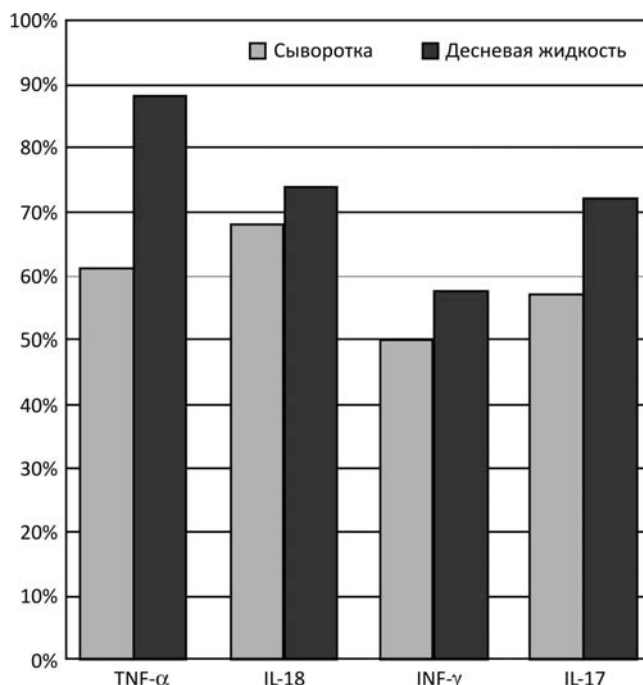


Рис. 7. Распределение количества пациентов с повышенным содержанием провоспалительных цитокинов в десневой жидкости пародонтальных карманов и в сыворотке крови пациентов с хроническим пародонтитом ($n = 147$).

($1,0 \pm 0,85$ пкг/мл) выявляется взаимосвязь — повышение содержания $TNF-\alpha$ сопровождается снижением содержания $IL-4$ с коэффициентом 5,0.

У практически здоровых отмечается обратная зависимость — содержание $IL-4$ ($2,7 \pm 1,7$ пкг/мл) выше, чем $TNF-\alpha$ ($0,5 \pm 0,4$ пкг/мл) с коэффициентом 5,4.

Некоторая взаимосвязь прослеживается между повышением и снижением содержания $IL-18$ ($2,93 \pm 80,75$ пкг/мл) и $IL-10$ ($4,14 \pm 1,09$ пкг/мл) соответственно с коэффициентом 1,8 и 1,4 относительно контроля ($160,51 \pm 41,6$ пкг/мл и $5,12 \pm 2,7$ пкг/мл соответственно).

Соотношение цитокинов остеокластогенеза sRANKL/OPG в сыворотке крови больных ХГП несмотря на некоторое повышение содержания sRANKL и OPG ($3,23 \pm 1,1$ пкг/мл $3,5 \pm 0,7$ пкг/мл соответственно) в 1,5 и 1,4 раза, остается практически без изменений относительно нормы ($2,15 \pm 1,5$ пкг/мл и $2,5 \pm 1,2$ пкг/мл соответственно) (рис. 6).

Суммарные результаты исследований содержания цитокинов в десневой жидкости и сыворотки крови больных ХГП, представленные в таблице, свидетельствуют, что наиболее информативным показателем изменений содержания провоспалительных цитокинов в десневой жидкости по сравнению с физиологической нормой является повышение уровня $TNF-\alpha$ (в 7 раз) и снижение уровня $IL-4$ (в 6,6 раза) и, что особенно важно, повышение индекса соотношения sRANKL/OPG в 2 раза за счет более выраженного повышения содержания в тканях пародонта sRANKL (в 4,8 раза) относительно практически здоровых лиц и менее выраженного повышения содержания в них OPG (в 2,27 раза относительно физиологической нормы).

В исследованиях содержания цитокинов в сыворотке крови больных ХП наиболее информативным показателем явился так же повышенный в 10 раз относительно контроля уровень содержания $TNF-\alpha$ и сниженный в 2,7 раза уровень $IL-4$ (таблица).

Следует отметить, что вышеуказанное повышение содержания наиболее информативного показателя — провоспалительного цитокина $TNF-\alpha$ в десневой жидкости пародонтальных карманов определялось в 88% случаев (рис. 7), а снижение содержания наиболее информативного показателя противовоспалительных цитокинов $IL-4$ определялось у 95% пациентов (рис. 8).

Повышение же содержания в десневой жидкости других провоспалительных цитокинов распределялось в сыворотке крови пациентов с ХГП относительно равномерно в 50—68% случаев (рис. 7).

Содержание цитокинов (пкг/мл) в жидкости десневого кармана и сыворотке крови больных хроническим пародонтитом (n = 147) (m ± σ)

Цитокины	Жидкость десневого кармана			Сыворотка крови		
	Здоровые	Хр. пародонтит	Коэф. повышения/понижения	Здоровые	Пародонтит	Коэф. повышения/понижения
TNF-α	36,3 ± 2,95	268 ± 37,16	7,38 ↑	0,5 ± 0,4	5,0 ± 1,2	10 ↑
IFN-γ	4,2 ± 1,23	69 ± 4,66	1,64 ↑	1,6 ± 0,3	2,92 ± 2,3	1,8 ↑
IL-17	0,7 ± 0,3	1,42 ± 1,01	2,02 ↑	2,0 ± 3,7	17,1 ± 2,3	8,55 ↑
IL-18	14,6 ± 5,6	30,32 ± 26,4	2,07 ↑	160,51 ± 41,6	293,76 ± 80,75	1,8 ↑
IL-4	12,7 ± 3,2	1,92 ± 1,3	6,6 ↓	2,7 ± 1,7	1,00 ± 0,85	2,7 ↓
IL10	2,7 ± 1,2	1,36 ± 0,92	1,98 ↓	5,12 ± 2,7	4,14 ± 1,09	1,2 ↓
sRANKL	3,15 ± 0,5	15,2 ± 2,3	4,8 ↑	2,15 ± 1,5	3,23 ± 1,1	1,5 ↑
OPG	3,3 ± 0,85	7,5 ± 0,3	2,27 ↑	2,5 ± 1,2	3,5 ± 0,7	1,4 ↑

Снижение содержания противовоспалительного цитокина IL-4 в десневой жидкости и в крови определялось у 95% пациентов с ХГП, наряду с этим снижение содержания другого противовоспалительного цитокина IL-10 определялось в 65% случаев (рис. 8), что соответствовало проценту пациентов с повышенным содержанием провоспалительных цитокинов в крови этих же пациентов (рис. 7).

Обращает на себя внимание, что количество пациентов с повышенным содержанием в крови цитокина препятствующего остеокластогенезу — sRANKL достигало 92% (рис. 9), хотя уровень его содержания относительно нормы превышал только в 1,5 раза и соответствовал параллельному повышению содержания цитокина OPG, способствующего остеокластогенезу (таблица).

Подобное повышение содержания OPG в крови исследованных пациентов с ХГП определялось только в 68% случаев (рис. 9).

Наряду с этим количество пациентов с ХГП с повышенным содержанием как sRANKL, так и OPG в десневой жидкости пародонтальных карманов было приблизительно одинаковым и составило 75% и 72% соответственно. Однако коэффициент повышения содержания sRANKL относительно физиологических значений у этих пациентов составил 4,8 раза, а коэффициент повышения OPG только в 2,27 (таблица).

Таким образом, развитие пародонтита сопровождается дисбалансом цитокиновой системы. Наблюдается повышение содержания провоспалительных цитокинов. Повышается также содержание цитокинов остеокластогенеза как в плазме, так и в десневой жидкости. Однако отношение sRANKL/OPG увеличивается недостоверно.

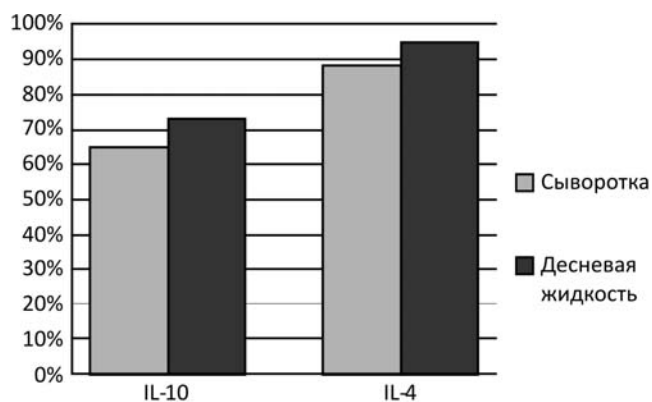


Рис. 8. Распределение количества пациентов с пониженным содержанием противовоспалительных цитокинов в десневой жидкости пародонтальных карманов и сыворотке крови пациентов с хроническим пародонтитом (n = 147).

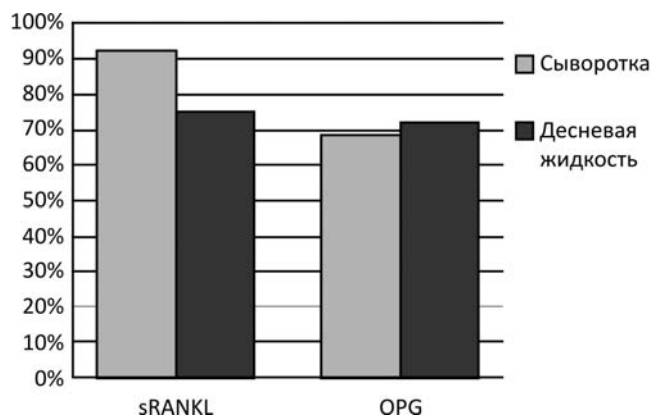


Рис. 9. Распределение количества пациентов с повышенным содержанием цитокинов остеокластогенеза в десневой жидкости пародонтальных карманов и сыворотке крови пациентов с хроническим пародонтитом (n = 147).

Список литературы

1. Pihlstrom B.L., Tabak L. The National Institute of Dental and Craniofacial Research: research for the practicing dentist. *Journal of the American Dental Association*. 2005; 136(6): 728–37.
2. Listgarten M.A. Pathogenesis of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 1986; 13(5): 418–30.
3. Tonetti M.S., Van Dyke T.E. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of Clinical Periodontology*. 2013; 40, Suppl. 14: S.24–S9.
4. Nibali L., Tatarakis N., Needleman I. et al. Clinical review: association between metabolic syndrome and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013; 98(3): 913–20.
5. Lalla E., Papapanou P.N. Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. *Nature Reviews Endocrinology*. 2011; 7(12): 738–48.
6. Lundberg K., Wegner N., Yucel-Lindberg T., Venables P.J. Periodontitis in RA—the citrullinated enolase connection. *Nature Reviews Rheumatology*. 2010; 6(12): 727–30.
7. Kornman K.S., Page R.C., Tonetti M.S. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology 2000*. 1997; 1997(14): 33–53.
8. Page R.C. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of Periodontal Research*. 1991; 26(3): 230–42.
9. Graves D.T. The potential role of chemokines and inflammatory cytokines in periodontal disease progression. *Clinical Infectious Diseases*. 1999; 28(3): 482–90.
10. Ge X., Rodriguez R., Trinh M., Gunsolley J., Xu P. Oral microbiome of deep and shallow dental pockets in chronic periodontitis. *PLoS ONE*. 2013; 8(6): e65520
11. Kinane D.F., Lappin D.F. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2001; 59(3): 154–60.
12. Page R.C., Schroeder H.E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease: a summary of current work. *Laboratory Investigation*. 1976; 34(3): 235–49.
13. Gemmell E., Yamazaki K., Seymour G.J. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 2002; 13(1): 17–34.
14. Wang J., Qi J., Zhao H. et al. Metagenomic sequencing reveals microbiota and its functional potential associated with periodontal disease. *Scientific Reports*. 2013; 31843
15. Williams R.C., Jeffcoat M.K., Kaplan M.L. Flurbiprofen: a potent inhibitor of alveolar bone resorption in beagles. *Science*. 1985; 227(4687): 640–2.
16. Graves D.T., Delima A.J., Assuma R., Amar S., Oates T., Cochran D. Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis. *Journal of Periodontology*. 1998; 69(12): 1419–25.
17. Assuma R., Oates T., Cochran D., Amar S., Graves D.T. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *Journal of Immunology*. 1998; 160(1): 403–9.
18. Delima A.J., Oates T., Assuma R. et al. Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and Tumor Necrosis Factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2001; 28(3): 233–40.
19. Mahanonda R., Pichyangkul S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontology 2000*. 2007; 43(1): 41–55.

Поступила 05.05.14
Received 05.05.14

Сведения об авторах:

Гуревич Константин Георгиевич (Gurevich K.G.) — д.м.н., профессор, зав. кафедрой ЮНЕСКО «Здоровый образ жизни — залог успешного развития» МГМСУ, e-mail: kgurevich@mail.ru

© Мартынова Е.А., Баранов В.И., 2014
УКД 577.152:612+577.354.26:612

Мартынова Е.А., Баранов В.И.

Активация перитонеальных нейтрофилов мышей при введении наночастиц карбида вольфрама *in vivo*

ГБОУ дополнительного профессионального образования Российская медицинская академия постдипломного образования, 123995, Москва, ул. Баррикадная, 2/1

Два образца наночастиц карбида вольфрама диаметром 15 и 50 нм, а также наночастицы карбида вольфрама с включением 8% кобальта ($d = 50$ нм) вводились внутрибрюшинно мышам FVB в дозах 0,005; 0,025; 0,05; 0,25; 0,5; 1; 2,5 и 5 мкг на 1 г веса. Через 3 часа и 36 часов показана активация перитонеальных нейтрофилов (по маркерам активации CD11b и S100), которая носила четкий бимодальный характер для всех наночастиц.

Ключевые слова: наночастицы, карбид вольфрама, нейтрофилы, активация

Martinova E.A., Baranov V.I.

Murine peritoneal neutrophil activation upon tungsten nanoparticles exposure *in vivo*

Russian Medical Academy of the Post-diploma education, 123995, Moscow, 2/1 Barrikadnaya St., e-mail: e.a.martinova@gmail.com

Two examples of tungsten carbide nanoparticles ($d = 15$ nm, 50 nm) and tungsten carbide nanoparticles with 8% cobalt ($d = 50$ nm) have been found to induce the neutrophil activation 3 h and 36 h after intraperitoneal administration in the doses 0.005; 0.025; 0.05; 0.25; 0.5; 1; 2.5 and 5 microgram per 1 gram body weight to FVB mice. Neutrophil activation was calculated based on the CD11b and S100 antigen expression. Effect of nanoparticles is bimodal for all tested examples.

Key words: nanoparticles, tungsten carbide, neutrophil activation

Нейтрофилы — это гетерогенная популяция клеток, выполняющих фагоцитарную, антибактериальную и иммунорегуляторную роль. В циркуляции обнаружено две субпопуляции, различных по размерам, гранулярности, экспрессии рецепторов (CD11b, Ly6G) и функциональной активности. В перитонеальной полости мышей нейтрофилы представляют собой гомогенную популяцию клеток по размерности и гранулярности, но выделяют две примерно равные по численности субпопуляции по экспрессии рецепторов CD62L⁺/CD43⁺ и CD62L⁻/CD43⁻, рецепторы CD11b, Ly6G, CD14 и CXCR2 экспрессируются на всех нейтрофилах [1]. В активации нейтрофилов принимают участие сигнальные пути ERK1/2, p38 MAPK, Akt, STAT3 [3,9]. Сигнальный путь p38 MAPK/STAT1 сопряжен с созреванием нейтрофилов и их гомеостазом [5]. Активированные нейтрофилы секретируют белок S100, который вовлечен в патогенез воспалительных заболеваний [2]. Белки S100A8 и S100A9 формируют регуляторный комплекс кальпротектин, который защищает ткани от окислительного повреждения свободными радикалами.

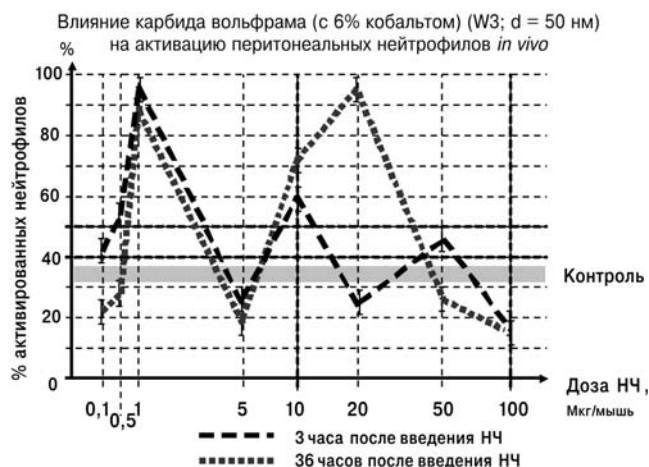
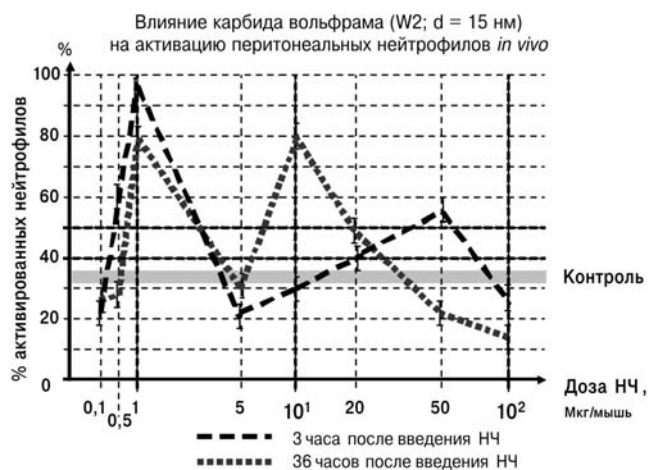
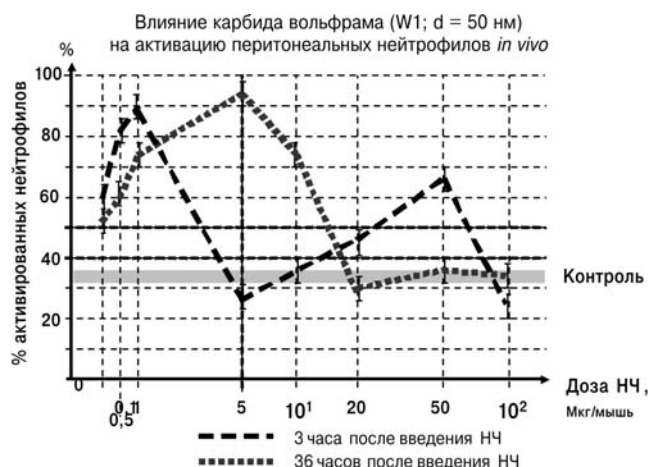
Этот механизм связан с контролем активации рецепторов PAR-2 [8].

Способность к миграции нейтрофилов через эндотелиальный барьер определяется адгезией к клеткам эндотелия. Это сопровождается повышением экспрессии молекул адгезии Mac-1 и CD66b на плазматической мембране нейтрофила [4]. Mac-1 — это гетеродимер, состоящий из двух субъединиц — α (M) (CD11b) и β 2 (CD18), необходимых для адгезии нейтрофилов через эндотелий, миграции в ткани, и для выполнения иммунорегуляторных функций [6]. Повышение экспрессии CD11b является маркером активации нейтрофилов. Mac-1 и LFA-1 относятся к β 2-интегринам, экспрессируемым на плазматической мембране, и за счет взаимодействия с их лигандом ICAM-1 регулирующих миграцию нейтрофилов.

Методика

Использованы нанопорошки карбида вольфрама, охарактеризованные в работе [7]. Символом W1 далее обозначен нанопорошок многокомпонентного карбида вольфрама диаметром (d) 50 нм, удельной поверхностью (S_p) 21—24 м²/г. Символом W2 обозначен нанопорошок монокарбида вольфрама

Для корреспонденции: Мартынова Елена Александровна, e-mail: e.a.martinova@gmail.com



Гистограмма, отражающая изменение процента активированных нейтрофилов перитонеальной полости мышей через 3 ч и 36 ч после введения наночастиц карбида вольфрама.

$d = 15$ нм, $S_p = 6-12$ м²/г. Символом W3 обозначен нанопорошок монокарбида вольфрама с осажденным кобальтом (8% от массы), $d = 50$ нм, $S_p = 9-11$ м²/г. Прирост кислорода за месяц хранения образцов в обычном воздухе составляет $\leq 0,05$ мас.%. Нанопорошки были взвешены в боксе, по 1 мг навесок растворяли в 1 мл H₂O_{bidest}, озвучивали в ультразвуковой бане 1 ч. Для контроля размера наночастиц аликвоты исходных растворов проанализированы с помощью электронной трансмиссионной микроскопии. Перед введением животным исходные растворы наночастиц титровали до соответствующей концентрации в физиологическом растворе, стерилизовали через фильтры $d = 22$ мкм. Наночастицы вводились *стерильно* в объеме 500 мкл в перитонеальную полость мышам в дозах 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 20; 50 и 100 мкг вещества на мышь (0,005; 0,025; 0,05; 0,25; 0,5; 1; 2,5 и 5 мкг на 1 г массы животных).

Работа проведена на мышах линии FVB (самцы, масса 19—20 г). Все эксперименты проводились согласно международным правилам работы с лабораторными животными («Principles of laboratory animal care», 1985, издание Национального Института Здоровья США, №88-23). Мыши получали стандартный гранулированный мышинный комбикорм ПК-120 и питьевую воду *ad libitum*. Животные содержались в отдельной комнате в тишине по 8 штук в клетке, соблюдался 12-часовой режим освещения при постоянной температуре +25°C. Мыши были рандомизированы по группам согласно схеме опыта. Каждая доза нанопорошков была введена 9 мышам с учетом повтором экспериментов. После введения наночастиц животные были гильотинированы через 3 ч (в этот период в перитонеум уже мигрировали популяции клеток, получившие соответствующие стимулы) или через 36 ч (в этот период четко проявляются эффекты, связанные с активацией нейтрофилов).

Перитонеальные клетки были отмыты центрифугированием 10 мин при 200 g, супернатант слит, к осадку добавлено 300 мкл 4% параформальдегида на фосфатном буфере. Для установления процента активированных нейтрофилов перитонеальные клетки отмывали и окрашивали FITC-конъюгированными моноклональными антителами к антигену S100B (PharmMingen) и CD11b (BioLegend), которые считаются маркерами активации нейтрофилов. Флуоресценцию образцов измеряли на проточном цитометре FACSDiva на канале FL1 при длине волны 530 ± 15 нм. В каждом образце анализировали 20 тыс. событий.

Все эксперименты проводились как минимум в трех повторах, полученные данные представлены как $M \pm m$. Данные анализировали по программе ANOVA, сравнение между двумя группами — по

критерию Стьюдента. Для статистического анализа более чем двух групп использовались методы множественного сравнения и критерий Ньюмена—Кейлса. Для этого с помощью дисперсионного анализа проверяют нулевую гипотезу о равенстве всех средних, если она отвергается, то все средние упорядочиваются по возрастанию и сравниваются попарно; $p \leq 0,05$ дается как статистически значимое различие между группами.

Результаты и обсуждение

Процент активированных нейтрофилов (по экспрессии маркеров активации) определялся по отношению в интактному контролю (клетки мышей, которым вводился физиологический раствор). На рисунке представлены гистограммы, отражающие изменение числа активированных нейтрофилов через 3 часа и через 36 часов после введения наночастиц. Следует обратить внимание на высокую степень подобия кривых для карбида вольфрама W1 и W2, различающихся диаметром наночастиц. Принципиальное отличие выявлено только для дозы 0,1 мкг на мышь, которая в случае наночастиц W1 вызывает активацию клеток, а в случае с W2 — ингибирование активации. В целом действие наночастиц карбида вольфрама на перитонеальные нейтрофилы носит бимодальный характер, что установлено и для других показателей. Это может быть объяснено появлением дополнительных внутриклеточных мишеней по мере изменения дозы. Также следует отметить тот факт, что доза наночастиц 1 мкг на мышь, которая во всех проведенных экспериментах вызывала максимальное увеличение числа нейтрофилов в перитонеальной полости, также обуславливает появление максимального процента активированных нейтрофилов для всех исследованных типов наночастиц через 3 часа после их введения мышам внутрибрюшинно. Доза 5 мкг на мышь для всех исследованных наночастиц оказывала негативное влияние на активацию нейтрофилов. Включение 8% кобальта в наночастицы карбида вольфрама W3 приводит к достоверному изменению формы гистограммы, отражающей влияние дозы введенных наночастиц на процент активных нейтрофилов. Появляется

четкий третий пик повышения активности клеток, что указывает на влияние дополнительного включения кобальта в состав наночастиц вольфрама.

Выводы

Наночастицы карбида вольфрама вызывают активацию нейтрофилов перитонеальной полости, эффект носит четкий бимодальный характер.

Список литературы

1. Arnardottir H., Freysdottir J., Hardardottir I. Two circulating neutrophil populations in acute inflammation in mice. *Inflamm. Res.* 2012; 61 (9): 931—9.
2. Cotoi O., Duner P., Ko N. et al. Plasma S100A8/A9 correlates with blood neutrophil counts, traditional risk factors, and cardiovascular disease in middle-aged healthy individuals. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2014; 34 (1): 202—10.
3. Hellberg L., Samavedam U., Holdorf K. et al. Methylprednisolone blocks autoantibody-induced tissue damage in experimental models of bullous pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita through inhibition of neutrophil activation. *J. Invest. Dermatol.* 2013; 133 (10): 2390—9.
4. Kim D., Haynes C. On-Chip evaluation of neutrophil activation and neutrophil-endothelial cell interaction during neutrophil chemotaxis. *Anal. Chem.* 2013; 85 (22): 10787—96.
5. Liu G., Hu X., Sun B. et al. Phosphatase Wip1 negatively regulates neutrophil development through p38 MAPK-STAT1. *Blood.* 2013; 121 (3): 519—29.
6. Maiguel D., Faridi M., Wei C. et al. Small molecule-mediated activation of the integrin CD11b/CD18 reduces inflammatory disease. *Sci. Signal.* 2011; 4 (189): 57—67.
7. Samokhin A., Alexeev N., Kornev S., Tsvetkov Yu. W-C nanosized composition synthesis and characterization. *19th International Symposium on Plasma Chemistry, Biochem., Germany.* 2009; 31—2.
8. Sun Y., Lu Y., Engeland C. et al. The anti-oxidative, anti-inflammatory, and protective effect of S100A8 in endotoxemic mice. *Mol. Immunol.* 2013; 53 (4): 443—9.
9. Yan B., Wei J., Yuan Y. et al. IL-6 cooperates with G-CSF to induce protumor function of neutrophils in bone marrow by enhancing STAT3 activation. *J. Immunol.* 2013; 190 (11): 5882—93.

Поступила 15.04.14
Received 15.04.14

Комиссарова С.В.¹, Дубровин И.П.¹, Пальцын А.А.^{1,2}

Регенерация нейронов

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

² — Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования Российская медицинская Академия последипломного образования, 123995, Москва, ул. Баррикадная, 2/1

В обзоре рассматривается развитие представлений о регенерации нейронов от утверждения «нервные клетки не восстанавливаются» до лавинообразного потока сообщений о нейрогенезе. Анализируется литература, посвященная четырем известным способам регенерации нейронов: 1 — нейрогенез; 2 — внутриклеточная регенерация; 3 — слияние ВМДС с нейронами Пуркинье в трансгенном эксперименте; 4 — слияние региональных клеток коры. Представлены некоторые тактические и методические проблемы, возникшие в исследованиях по регенерации. Излагаются соображения о месте указанных способов регенерации в современной неврологии.

Ключевые слова: нейрогенез, слияние клеток, регенерация мозга

Komissarova S.V.¹, Dubrovin I.P.¹, Paltsyn A.A.^{1,2}

Regeneration of neurons

¹ — Institute of General Pathology and Pathophysiology of the Russian Academy of Medical Sciences, 125315, Baltiskaya Street, 8, Moscow, Russia

² — Russian Medical Academy of Postgraduate Education, 123995, Barricadnaj Street 2/1, Moscow, Russia

Describes the development of ideas about the regeneration of neurons from the approval «neurons are not restored» to an avalanche stream of messages on neurogenesis. We analysing literature about four ways of neuron regeneration. 1 — neurogenesis; 2 — intracellular regeneration; 3 — BMDC fusion with Purkinje neurons in transgenic experiment; 4 — regional cortical cells fusion. In observed some tactical and methodological problems which appears in researches about regeneration. Describes the reasons about the place of these methods of regeneration in modern neuroscience.

Key words: neurogenesis, cell fusion, brain regeneration

Способность мозга взрослых млекопитающих восстанавливаться после повреждений известна. Для объяснения этой способности надо знать, во-первых, какие изменения нейронов обеспечивают восстановление и, во-вторых, как после повреждения организуется ткань мозга: нейроны, глия, сосудистая сеть. В XIX и XX веках предпринимались многочисленные попытки исследовать механизм восстановления нейронов. Идеологической предпосылкой этих попыток было убеждение в том, что в любом органе единственным выражением восстановления является размножение обеспечивающих функцию клеток. Структурно-функциональная сложность зрелых клеток мозга, непосредственно обеспечивающих его функцию, т.е. нейронов и глиоцитов, несовместимость этой сложности с «хореографией» митоза, конечно, была замечена «старыми», но неплохо ориентирующимися в исследуемой проблеме авторами. Они понимали бесперспективность поиска картин митоза в нейронах или глиоцитах. Формули-

ровки «нейральная стволовая клетка» в то время не было, но это не очень влияло на направление и глубину проникновения исследовательской мысли. Ученые искали деление не нейронов, а сегодняшних стволовых и прогениторных клеток в то время называвшихся камбиальными. Иными словами, идеологически (но не методологически) прошлые эксперименты по регенерации мозга были вполне разумны по современным научным меркам. Выводы этих экспериментов были практически однозначны (исключения будут рассмотрены) — деления клеток нет, нейроны взрослых млекопитающих не обновляются. Это мнение отражено в руководствах XX века по гистологии. Вековую непоколебимость мнения иллюстрируют цитаты из руководств, изданных в 1908 и 2001 гг. Профессор Московского университета И.Ф. Огнев писал в учебнике гистологии 1908 г. [4] «Жизнь нервных клеток длится столько же времени, сколько и жизнь целого организма, в состав которого они входят». Профессора Казанского университета Э.Г. Улумбеков и Ю.А. Чельшев по существу повторили [13] в учебнике гистологии 2001 г. «Нейроны — классический пример клеток, относя-

Для корреспонденции: Комиссарова С.В. — науч. сотр. лаб. регуляции репаративных процессов ФГБУ НИИОПП РАМН, e-mail: lrrp@mail.ru

щихся к статической популяции. Ни при каких условиях они *in vivo* не способны к пролиферации и обновлению». Так же думал Сантьяго Кахаль. Общепринятость представления о равной продолжительности жизни нейронов и индивидуума отразилась в опирающейся на авторитет Кахалья поговорке: «нервные клетки не восстанавливаются».

Таким образом, исследования XIX, XX веков не разрешили, а лишь ужесточили противоречие жизни (практики) и теории в проблеме регенерации мозга. Нервные болезни подвергаются обратному развитию, а нейроны не восстанавливаются. Размышление об этом противоречии рождало следующие вопросы:

1. Может быть, результаты, отвергающие новообразование клеток в мозге, ошибочны?
2. Может быть, связь регенераторной реакции с клеточным делением, верная для многих органов тела, не соблюдается в мозге, а компенсация нарушенных функций проявляется в какой-то иной форме, нежели в других органах?

Мыслительный и экспериментальный поиск ответов оказались плодотворными и создали современное представление о процессах регенерации мозга. Интересным моментом истории науки стало то обстоятельство, что основополагающие работы по первому предположению были сделаны иностранными учеными, а по второму — русскими.

Первым серьезным указанием на существование деления предшественников и обновления нервных клеток мозга (нейрогенеза в точном смысле слова, нейрогенеза по сложившейся в литературе традиции) стали работы Altman'a с соавторами, выполненные в 60-х годах XX века [15—18].

Оставалось 30 лет до открытия нейральной стволовой клетки но, схема экспериментов показывает, что по существу у исследователей не было лишь слова стволовая в языке, но в уме было четкое понятие о биологической сущности явления. Работы Altman'a с соавторами выполнены методом автордиографии, сегодня неразумно забытым. Меченый тритием низкомолекулярный компонент ДНК — нуклеозид тимидин, будучи введенным в организм, включается в те клетки, которые во время циркуляции тимидина находились в периоде синтеза ДНК. Если интересующий исследователя объект зафиксировать через 1—2 ч после введения тимидина, то β -излучение трития будет обнаружено во всех клетках, вступивших в митотический цикл и создающих перед делением второй набор хромосом. Altman с соавторами понимали, что нейроны не могут быть в митотическом цикле и синтезировать ДНК. Поэтому материал фиксировали не через 1—2 ч, а через 30—70 сут. после введения тимидина. Они полагали, что за этот срок предшественники нейронов, готовившиеся в момент

циркуляции тимидина к митозу и включившие тимидин, пройдут дифференцировку, превратятся в зрелые, неделящиеся клетки и метка обнаружится над нейронами. Надежда авторов оправдалась. В гранулярном слое зубчатой извилины гиппокампа они нашли меченые ядра, соответствующие величине и расположением гранулярным нейронам. Проверка и перепроверка наблюдений не разубедила Altman'a и его сотрудников в существовании постнатального нейрогенеза. Однако как это нередко случается с открытиями, отношение к новости научного сообщества было пренебрежительным и предвзято отрицательным. Позднее проведено автордиографическое исследование зубчатых извилин гиппокампа и обонятельных луковиц у 3-месячных крыс [49]. Для большей убедительности своих результатов Kaplan и Hinds применили электронно-микроскопическую идентификацию меченых тимидином клеток. Они показали дендриты и синапсы у меченых клеток. Но и эта работа не спасла идею нейрогенеза от неприятия современниками. «Нервные клетки не восстанавливались» до конца века.

Психологический перелом произошел в конце прошлого века под влиянием открытия В. Reynolds и S. Weiss [82] нейральной стволовой клетки. Из стриатума взрослых мышей выделяли клетки, которые при последующем культивировании *in vitro* экспрессировали маркер прогениторов — нестин, а затем дифференцировались в клетки морфологически и иммуноцитохимически не отличавшиеся от нейронов и астроцитов. Это наблюдение очень скоро было подтверждено [65, 83]. Превращение стволовой клетки в нейроны наблюдали и *in vivo* [90].

Открытие нейральной стволовой клетки вызвало несоизмеримое с прежними годами увеличение числа попыток найти постнатальный нейрогенез. Вторым следствием открытия стало исчезновение предвзято отрицательного отношения к находкам. Открытие не только нейральной, но и всех остальных стволовых клеток породило романтические надежды на их скорое терапевтическое использование. В ослеплении увлеченности многие (профессионалы) решили, что стволовые клетки это готовый или почти готовый препарат, введением которого можно вылечить многие тяжелые болезни. Найти нейрогенез очень хотелось, и журналы запестрели описаниями удач. В двух зонах мозга (как раз тех, о которых писали первооткрыватели Altman и Kaplan) постнатальный нейрогенез находили наиболее часто, количество новых нейронов было максимальным, а количество опровергающих сообщений минимальным. Эти зоны — субвентрикулярная боковых желудочков мозга [32, 46, 66] и субгранулярная зубчатой фасции гиппокампа [37, 51, 52, 53, 58].

В 1998 г. появилось сообщение о нейрогенезе в гиппокампе человека [35]. В 90-х годах XX века клеточное размножение определяли, как и раньше, по включению низкомолекулярного предшественника в ДНК нейронов. Однако в противоположность предыдущим десятилетиям тимидин заменили его аналогом — бромдиоксиуридином (BrdU) [68]. Многие достоинства тимидина (меньшая токсичность, отсутствие необходимости денатурировать ДНК и тем повреждать ткань [104], возможность получать количественные данные, меньшая склонность к изменению судьбы клетки, включившей естественный нуклеозид — тимидин, а не синтетический BrdU [33], меньшая вероятность, даже невозможность, перекрывания меченного ядра немеченным) были пожертвованы двум преимуществам BrdU.

1. Флуоресцентную метку BrdU можно совмещать с флуоресцентно-мечеными маркерами нейронов [70] или предшественников нейронов и по присутствию маркера судить о том, какая клетка новообразовалась (пометилась BrdU);

2. Результат эксперимента с тимидином приходится ждать 2—6 нед. для накопления в фотослое метки, а результат с BrdU можно узнать в день фиксации материала по связыванию клеткой антител к BrdU, меченных ферментом или флуорохромом.

BrdU иногда вводится человеку для определения по результатам анализа биопсий скорости пролиферации опухолей. Именно эти ситуации и были изучены Eriksson с соавторами [35]. Они описали данные исследования мозга у пяти больных, умерших через 15 дней — 2 года после введения BrdU. У всех был обнаружен нейрогенез в гиппокампе.

Нейрогенез в гиппокампе подвергся особо тщательному и многостороннему исследованию. Был не просто доказан факт новообразования нейронов в гиппокампе взрослых млекопитающих, но морфологически прослежена интеграция новообразованных нейронов в местную сеть [95, 96, 108]. Обнаружена связь нейрогенеза с обучением и памятью [54, 73, 88, 92, 102, 103], с поведением и локомоторными способностями животных [41]. Показана зависимость нейрогенеза от действия повреждающих факторов среды [69]. Выяснилось, что благотворное действие физической нагрузки на функции гиппокампа реализуется через нейрогенез [80]. При лечении моделированной болезни Альцгеймера наблюдали синхронное повышение нейрогенеза и улучшение когнитивной функции [98].

Таким образом, сегодня не нужно доказывать существование нейрогенеза в гиппокампе. Журналы содержат многочисленные сообщения о влиянии нейрогенеза на функции гиппокампа. Столь же несомненен нейрогенез в субвентрикулярном слое боковых желу-

дочков и миграция нейробластов в обонятельные луковицы [66]. Установлена связь субвентрикулярного нейрогенеза с обонятельной функцией [27]. Нейрогенез в субвентрикулярной зоне, миграция в обонятельные луковицы и интеграция в местные сети необходимы для нормального осуществления обонятельной функции [62]. Нейрогенез в обонятельных луковицах, подобно гиппокампаму, обнаружен не только у грызунов, но и у человека [28].

Регенерация нейронов в коре. После открытия и окончательного доказательства нейрогенеза в гиппокампе и в окружности боковых желудочков в нейробиологии утвердился термин «нейрогенные», обозначающий зоны собственно нейрогенеза: субгранулярный и субвентрикулярный слой, а также зоны, куда приходят нейробластами вновь образованные нейроны: гранулярный слой зубчатой извилины и обонятельные луковицы. Все остальные отделы мозга называют «не нейрогенными». Были заявления и даже неоднократные о нейрогенезе в коре, стриатуме, амигдале, гипоталамусе, черной субстанции, стволе мозга [36]. Но всё же определение «не нейрогенные» за перечисленными отделами сохранилось. Причина простая: последующие исследования не подтвердили первичных заявлений [64]. Последнее предложение относится ко всем перечисленным участкам мозга.

Однако в данном обзоре на вопрос о нейрогенезе в коре нельзя ответить одним предложением, его следует рассмотреть подробнее. Причин для этого несколько. Кора — область особого интереса нейробиологии. Это отразилось и в количестве исследований нейрогенеза в коре, несоизмеримым с другими зонами мозга. Неоднократно объектом изучения был мозг человека, но не было сообщений об обнаружении нейрогенеза в коре. Упорство сторонников нейрогенеза в коре намного больше, чем сторонников нейрогенеза других локализаций. Если одни согласились с возражениями, то другие «корьеристы» продолжают публиковать свои данные. Мы не принимаем их как доказательства, но, стремясь быть объективными, не считаем возможным игнорировать без объяснения нашей позиции. Устойчивость идеи нейрогенеза, непрекращающиеся упорные поиски его живут на двух догмах:

1) упрощенческое, безальтернативное сведение сложного процесса регенерации только к пролиферации клеток;

2) столь же упрощенное понимание роли стволовых клеток только как поставщиков новых поколений дефинитивных клеток органа, непосредственных исполнителей функции (в мозге таковыми мыслятся только нейроны).

Непроизносимой, но ощущаемой подоплекой живучести мечты о нейрогенезе является ложное убеж-

дение в том, что отсутствие нейрогенеза означает провал популярнейшей сегодня идеи лечения стволовыми клетками. Так, японские исследователи Takayuki Nakagomi и др. [71] признают, что хотя они не нашли дифференцировку нестин-положительных клеток в нейроны в постинсультной коре, такие клетки могут развиваться: «Although we could not detect differentiation of nestin-positive cells into neurons *in vivo*, our current observations indicate that endogenous neural stem/progenitors with the potential to become neurons can develop within post-stroke cerebral cortex». Несмотря на недоказанность превращения предшественников в нейроны, их появление рассматривается как восстановление поврежденной коры: «...cells in the injured cerebral cortex have the potential to serve as a source for neurons driving CNS repair after brain injury» и перспектива клеточной терапии: «Identification of neural stem progenitor cells in the adult CNS raises the possibility of repair of CNS lesions, including repopulation of such damaged areas with neurons».

Давно, когда слова «стволовая клетка» были известны только их автору А.А. Максимова и читателям его книги [2], универсальность этих догм была всемирно скомпрометирована регенерацией печени, осуществляющейся, главным образом, не по догмам, а полиплоидией. Но этот факт не учитывается в рассуждениях о восстановлении системы такой «неудобной» для пролиферативного варианта регенерации, как ЦНС. Не обращается внимание на то, что в глиоцитах и нейронах нет митозов. На то, что идея смены клеточных поколений плохо или совсем не вяжется с хранением нейронами памяти в течение всей жизни индивидуума, на то, что пролиферация настолько несвойственна нейронам, что они никогда не образуют опухолей и, наконец, на то, что нейральная стволовая клетка, выделенная из коры, в культуре обычно дифференцируется только в глиоциты. Её можно заставить дифференцироваться *in vitro* в нейроны, но для этого нужно повысить концентрацию ростовых факторов до уровня многократно превышающего тот, который достаточен для нейрональной дифференцировки стволовой клетки из гиппокампа [77]. Наконец, в рассуждениях о регенерации мозга почти не звучит тема о возможности компенсации ущерба не путем восполнения количества утраченных функционирующих структур — нейронов, а путем восполнения количества утраченных функционирующих структур — синапсов. Имеются пока немногочисленные, но интересные и перспективные для терапии данные о синхронизации низкочастотной электрической активности поврежденных ишемией нейронов. Эта активность совпадает с усиленным ростом аксонов и несвойственна неповрежденным нейронам [23—25, 29, 43]. Иными словами, ускоряется образование новых

связей между нейронами, что может компенсировать утрату части этих клеток.

Эти особенности ЦНС хорошо согласуются с теорией регенерации, созданной Д.С. Саркисовым [8—11]. Основной постулат теории идет от глубинных основ мироздания. В природе нет ничего кроме материи и движения. Движущая сила живой материи — взаимодействие разрушения и восстановления, распада и синтеза, диссимилиации и ассимиляции. Восстановление во всех его формах и есть регенерация. Иными словами регенерация — одна из двух составляющих явления под названием жизнь. Регенерируют все живые объекты, но различно, соответственно их структурно-функциональным особенностям. Регенерация выполняет в природе структурно-функциональную задачу, она обеспечивает функцию путем постоянного воссоздания выполняющих эту функцию структур. Самой малой биологической структурой является молекула. Макромолекулы клетки постоянно разрушаются и воссоздаются. То же происходит и с надмолекулярными внутриклеточными структурами. Этот вечно текущий в клетках процесс разрушения и восстановления Д.С. Саркисов называл внутриклеточной регенерацией. Философски безупречную, и в этом смысле не требующую доказательств теорию, Д.С. Саркисов доказал многими убедительными биологическими фактами. Понятно, что внутриклеточная регенерация свойственна всем разновидностям клеток организма. Почти все разновидности клеток организма регенерируют не только внутриклеточно, но и путем смены клеточных поколений. А нейроны, как считал Д.С. Саркисов, регенерируют только внутриклеточно. Этим объяснением он устранил вековое противоречие восстанавливаемости мозга и якобы не восстанавливаемости нейронов. Конечно, Д.С. Саркисов прав и нейроны восстанавливаются путем внутриклеточной регенерации. Но в то же время этот факт сам по себе, не исключает возможность регенерации нейронов и другим путем. Уже в течение 20 лет после открытия нейральной стволовой клетки в качестве другого пути разыскивается нейрогенез. Но до сих пор нет уверенности в том, что в большинстве отделов мозга нейрогенез — реальность.

В литературе, посвященной локальному воспалению в коре, главное внимание уделяется регенерации нервной ткани. И этот вопрос, на наш взгляд, не решается или решается формально. Регенерация мыслится только как нейрогенез [48]. С начала XXI века и до сих пор появляются публикации, в которых выражается мнение, что нейрогенез в коре отсутствует только в нормальных условиях, а при болезни, локальном воспалении в частности, он обнаруживается [71, 87]. Однако доказательства того, что описываемые события есть нейрогенез, недостаточны, они не

соответствуют современному уровню науки, так, Sai-по с соавторами [87], описывая динамику содержания при инсульте нестин-положительных клеток, почему-то и в тексте и даже в заглавии употребляют слово *нейрогенез*. Близкую по идее, методике эксперимента и по трактовке результатов работу опубликовали Jing-Hui Xue с соавторами [105]. Авторы в качестве доказательств новообразования нейронов представили совмещение метки BrdU или даже PCNA (менее надежный маркер пролиферации, чем BrdU) с GFAP и нестином. GFAP — маркер астроцитов, нестин — маркер прогениторных клеток не только нейрональной, но и глиальной дифференцировки. Пожизненная пролиферация глиоцитов не нуждается в доказательствах, она доказана [20, 21, 26, 89], а нейрогенез не доказан, да и в обсуждаемых работах не показали меченых BrdU зрелых нейронов. Поэтому более правдоподобно рассматривать нестин-положительные клетки в качестве предшественников глиоцитов. Таковую трактовку подтверждает исследование [89], в котором при повреждении коры у взрослых мышей обнаружена лишь пролиферация клеток, находящихся на различных этапах дифференцировки олигодендроцитов. В разном по количеству использованных иммуноцитохимических методов исследовании [74] и в названии и в тексте публикации ставится слово *нейрогенез*, а в документах представлены CDX⁺ (маркер нейробластов) клетки. Гибель нейробластов описана [94] и нет гарантии их обязательного превращения в нейроны.

Конечно, в таком сложном, противоречиво излагаемом вопросе как *нейрогенез* в коре, реальность которого не доказана, следует быть осторожнее и не использовать слово *нейрогенез* в тех случаях, когда не установлено образование *нейронов*. Авторы описывают миграцию *предшественников* в перинфарктную зону коры из субвентрикулярного слоя (на 4 мм у мышей). Указывают на тесную связь «нейрогенеза» с васкуляризацией и поэтому перинфарктную зону называют *нейроваскулярной* нишей.

В обсуждаемых выше работах строгих доказательств *нейрогенеза* просто не было и утверждения о нем основывались только на такой ненаучной категории, как внутренняя убежденность авторов. Возникла устойчивая привычка не считаться с общепринятым по итогам большого труда разделением мозга на *нейрогенные* и не *нейрогенные* зоны. Привычка выражается в использовании слова *нейрогенез* в заглавиях статей, описывающих экспериментальные исследования инсульта в любых отделах мозга. Таких сообщений много, и своим изобилием они создают представление, что *нейрогенез* обыденное явление, почти как эритрогенез. Из чтения текста становится ясно, что *нейрогенез* (не отметив этого в названии) авторы ре-

гистрировали в *нейрогенной* зоне, где он действительно обыденное явление, а инсульт развивался в других не *нейрогенных* отделах мозга. Получается, что авторы научных работ, если прямо не искажают научную истину, то, по крайней мере, не стремятся просто, без затей изложить её читателю. Как нечастый пример ответственного отношения к заголовкам о *нейрогенезе* при инсульте приводим сообщение [109].

Методика поиска *нейрогенеза* сложна и, как всякая сложная методика, таит много возможностей для ошибок. В работах, где такие возможности старались закрыть, педантично подбирали схему эксперимента, где для идентификации зрелых нейронов использовали строгие морфологические и цитохимические критерии, не удавалось обнаружить ни *нейрогенез* в коре, ни признаки миграции в кору *нейральных* предшественников из субвентрикулярного слоя [14, 21, 34, 55, 57, 59, 91, 71]. Один из ведущих современных *нейроморфологов* P. Rakic уже в 2002 г. (*Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis*. J. Neurosci. 2002, Vol. 22(3): P. 614—618) обращал внимание энтузиастов *нейрогенеза* на необходимость строго контролировать наблюдения и не навязывать природе желание исследователя. В статье, озаглавленной: «*Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis*» он писал: «the compelling desire for curing neurological disorders has fostered an uncommon willingness to accept unsound evidence for adult neurogenesis under normal and experimental condition» (неконтролируемое желание лечить неврологические болезни способствовало повышенной готовности признать ненадежные доказательства *нейрогенеза* у взрослых). Неубедительность «доказательств» появления новых нейронов в коре отражена в дискуссии по техническим моментам исследования *нейрогенеза* на страницах журнала Science под выразительным названием *New neurons: extraordinary evidence or extraordinary conclusion?* [72].

Современный уровень науки представляет, по существу, один способ доказательства *нейрогенеза*. Должен быть показан, несомненно, нейрон, содержащий несомненное свидетельство протекавшего некогда (в предшественнике нейрона) *репродуктивного* (т.е. в S-периоде клеточного цикла) синтеза ДНК. Если несущий метку предшественник ДНК вводил в взрослому животному, то такой препарат доказывает *постнатальный* *нейрогенез*. Как уже отмечалось, в качестве предшественника ДНК сейчас используется только BrdU [68]. Есть заявления, что метка BrdU позволяет безошибочно идентифицировать *in vivo* новые нейроны. «Technical advances such as the use of bromodeoxyuridine (BrdU) have facilitated unambiguous identification of adult-generated cells in vivo as new neurons» [64]. Но BrdU может включаться

и в ходе *репаративного* синтеза ДНК [50, 106]. Конечно, репаративный синтез ДНК в нейронах усиливается при повреждениях мозга [60]. Это может стать причиной ложного «обнаружения» усиленного нейрогенеза в коре после инсульта [87].

В качестве типичного примера работы, описывающей нейрогенез в коре после инсульта можно привести часто цитируемую в источниках литературы по инсультам статью W. Jiang с соавторами [45]. Авторы подчеркивают, что в норме нейрогенез в коре не происходит. О том же свидетельствует и их эксперимент, в котором у ложно оперированных крыс не находили клеток, совмещавших метку BrdU с меткой какого-либо из трех использованных ими маркеров зрелых нейронов. Через 30 и 60 дней после временной окклюзии средней мозговой артерии в мозге находили десятки клеток с колокализацией указанных маркеров. Количество клеток с двойным мечением увеличивалось с приближением к очагу некроза. Иными словами, описана классическая ситуация для возникновения репаративного синтеза ДНК: синтез только при повреждении и усиливающийся с увеличением степени повреждающего воздействия. Но авторы такое объяснение результатов не рассматривают и соответствующих контролей не делают. Следует особо подчеркнуть, что всё направление работ, свидетельствующих об отсутствии нейрогенеза в норме и возникновении в условиях патологии, покоится на шатком и недоказанном основании. Пока неизвестны примеры регенераторных реакций, которые не были бы механизмом гомеостаза, а были «предусмотрены» природой только для болезни. Иными словами, механизмами репаративной регенерации, не имеющими соответствующих прототипов в механизмах физиологической регенерации. Д.С. Саркисов [10] излагал эту мысль так: «регенерация — это процесс обновления структурных элементов организма и восстановления их количества после повреждения, обеспечивающий нормальную работу органов и нормализацию их нарушенных функций при патологических процессах».

Демонстрация репаративного синтеза ДНК в качестве репродуктивного не единственный механизм ошибочного «выявления» нейрогенеза. В работах с BrdU не только возможна, но наверняка постоянно присутствует, если не применять специальных мер, ошибка наложения, т.е. признание двух ядер, расположенных друг над другом, за одно ядро. Если одно из них, верхнее или нижнее неважно, ядро нейрона, оно, конечно, окрасится специфическим нейрональным маркером. Если другое ядро не нейрона, оно вполне может оказаться меченым BrdU. Рассматриванием, даже внимательным, такой «бутерброд» трудно отличить от одной клетки, совмещающей оба маркера, т.е. искомого новообразованного

нейрона. Вот еще один путь проникновения «нейрогенеза» в журналы. В современной цитохимии часто используется конфокальный микроскоп. Тонкость оптического конфокального среза дает возможность получить красивые с малым фоном картинки якобы доказывающие нейрогенез в коре [38, 42]. Гораздо реже используются уникальные аналитические возможности этого прибора. Конфокальный микроскоп позволяет уверенно различить наложение и совмещение метки. Нужно сканировать срез по трем плоскостям, создать пространственную реконструкцию и рассмотреть предполагаемое совмещение в фас, профиль и снизу. Такой анализ дает надежный результат [31, 37, 86]. Во всех случаях обнаружения в коре клеток с двойной меткой BrdU⁺/NeuN⁺ анализ таких клеток методом пространственной реконструкции в конфокальном микроскопе, обнаруживал, что колокализации меток нет, и метку BrdU несет глиальная клетка, расположенная *рядом* с меченым NeuN нейроном [14].

Существует метод клеточной биологии, позволяющий обнаружить делящуюся клетку без использования предшественников ДНК — инфицирование некоторыми классами ретровирусов. Используются вирусы, которые проникают в клетку только в период митоза, когда отсутствует защищающая геном ядерная мембрана [63, 84]. Если к такому вирусу «прицепить» метку, например, ген зеленого флуоресцентного белка (green fluorescent protein — GFP), то получится вектор, проникновение которого метит зеленым цветом постмитотическую клетку на всю оставшуюся жизнь. Преимущество этого метода перед BrdU-методом заключается в отсутствии артефакта, обусловленного репаративным синтезом ДНК. Кроме того метка GFP, в отличие от метки BrdU, не экранирует структуры клетки, не затрудняет её морфологическую идентификацию [76]. Для исследования нейрогенеза в коре ретровирус впервые применили Ackman с соавторами [14].

В большом (123 крысенок в возрасте 2—19 дней и 11 взрослых крыс) и педантично проведенном эксперименте они находили зеленые нейроны в неокортексе через 48 ч после введения в мозговые желудочки ретровируса с GFP. Через 3 нед. после инфицирования такие нейроны не встречались. Метка BrdU никогда не колокализовалась с GFP или NeuN. Зелеными были клетки по морфологии и цитохимии идентифицированные как астроциты, олигодендроциты, полидендроциты (т.е. NG2⁺ клетки) и микроглиоциты. Исследование 642 зеленых пирамидных нейронов путем объемной реконструкции в конфокальном микроскопе обнаруживало слияние с апикальным дендритом нейрона тела маленькой клетки морфологически похожей на микроглиоцит и несущей метку

ОХ42 (иммуноцитохимический маркер активированной микроглии) и IB4 (гистохимический маркер микроглии). Таким образом, зеленая окраска пирамидных нейронов обуславливалась не тем, что их предшественники заражались геном GFP, а тем, что в тело нейрона перемещался GFP из микроглиальной клетки. Это подтверждается и временной динамикой появления (слишком быстрого — 48 ч) и исчезновения (тоже стремительного — 3 нед.) зеленой метки.

Метка GFP стала ценным методом клеточной биологии. За него в 2008 г. дали Нобелевскую премию. Зеленую метку GFP можно внести генно-инженерным методом в яйцеклетку мыши [75]. В результате этого действия все клетки родившегося мышонка, кроме эритроцитов и волос, светятся зеленым цветом под лучом возбуждения. Получаются зеленые трансгенные мыши. Зеленый цвет клеток дает возможность проследить их судьбу в различных ситуациях, в частности при пересадке в немеченые организмы. Трансгенные пересадки были использованы для изучения дифференцировки стволовых клеток. Казалось, что какие бы превращения не претерпела донорская клетка в организме реципиента, её всегда можно будет узнать по зеленой флуоресценции. Наш интерес к этим экспериментам обусловлен тем обстоятельством, что нейрогенез есть результат дифференцировки нейральной стволовой клетки.

Трансгенные пересадки осуществляют следующим образом. Взрослые мыши-реципиенты получают смертельную дозу облучения. Затем вводят им костный мозг — bone marrow-derived cells (BMDC) от взрослых GFP-положительных доноров. Для подавления реакции трансплантат — против хозяина реципиенты получают большие дозы иммунодепрессантов. Естественно после таких манипуляций у реципиентов находят много зеленых клеток крови. Не так естественно и очевидно, но, тем не менее, это было — встречались зеленые дифференцированные клетки других тканей. Чтобы не отвлекаться от темы, скажем только о мозге. Первые известия о том, что BMDC, развиваясь в теле реципиента могут пересекать рубежи зародышевых листков и из мезодермальных превращаться в эктодермальные клетки мозга появились на рубеже веков в 2000 г. [22, 67]. Выход за границы зародышевых листков получил три красивых названия: пластичность стволовых клеток, трансдифференцировка, трансдетерминация.

В 2001 г. была опубликована статья Priller с соавторами [81], обнаруживших в мозжечке реципиентов через год после трансгенной пересадки зеленые нейроны Пуркинье. Точность идентификации клеток не вызывает сомнений. Нейроны Пуркинье уже по топографии расположения и по морфологии нельзя спутать ни с одной другой клеткой организма. Кроме того, зеле-

ные клетки были опознаны и цитохимически: экспрессировали специфические маркеры зрелых клеток Пуркинье: декарбоксилазу глутаминовой кислоты и кальбиндин. Объяснение Priller с соавторами полностью соответствовало моде 2001 г. Они сочли, что мезодермальная BMDC стала эктодермальным нейроном. Иными словами, BMDC прошла столь большой и сложный путь развития, что превратилась в клетку другого зародышевого листка — трансдифференцировалась. Объяснение казалось обоснованным: ведь нейрон зеленый, следовательно, он — ставшая нейроном BMDC. Авторов не смутило то, что чудесное превращение произошло не с эмбриональной клеткой, отличающейся повышенной пластичностью, а с клеткой взрослого животного и в организме взрослого животного с давно (в эмбриональном периоде) сформированным мозжечком. Но, повторяем, эта трактовка не была плодом пылкого воображения маленькой группы людей — авторов статьи. В то время так думала большая часть научного сообщества. Конечно, по до сих пор не изжитому, а в то время безудержному, стремлению всеместно пересаживать стволовые клетки, Priller с соавторами рекомендуют трансплантацию BMDC для лечения в клинике двигательных расстройств. Рекомендация смелая, если не сказать легкомысленная. Во-первых, потому, что при исследовании целого мозжечка находили всего несколько зеленых нейронов Пуркинье, а во-вторых, — условия трансгенного эксперимента бесконечно далеки от реальных условий развития болезней человека.

Серьезный удар по идее постнатального нейрогенеза, а заодно и по популярным и слишком оптимистично оцениваемым представлениям о трансдифференцировке нанесла группа публикаций появившаяся в 2002—2003 гг. [19, 40, 93, 97, 99, 107]. В этих статьях было заявлено, что стволовая клетка может сливаться с дифференцированной клеткой различных тканей. По этой причине «классическое» доказательство пластичности вообще и, в частности, пластическое появление во взрослом мозге нейрона, «трансдифференцировавшегося» из BMDC оказались артефактом. Открытая возможность слияния BMDC дает другое, не столь фантастичное объяснение результатов, якобы демонстрирующих трансдифференцировку. BMDC не превратилась в дефинитивную клетку. У Priller с соавторами — это нейрон Пуркинье. Специфические особенности «взрослого» нейрона Пуркинье не были созданы самостоятельно BMDC. Она просто слилась с дифференцированным нейроном и передала ему свой маркер — зеленый цвет. Следует оговориться, что выше излагались результаты экспериментов *in vivo*. *In vitro* можно изменением условий культивирования добиться трансдифференцировки и превращения мезенхимальной стволовой клетки костного мозга в клетку любого зародышевого листка [106].

Таким образом, трансгенные пересадки вначале, как казалось, доказывающие нейрогенез (да ещё самых сложных нейронов) у взрослых млекопитающих, впоследствии обнажили ошибочность «находок» не только нейрогенеза, но и генеза клеток в некоторых других органах. Этим методом впервые было обнаружено слияние стволовых или прогениторных клеток с нейронами, пока только с одним видом нейронов — клетками Пуркинье [19, 101]. Относительно нейронов Пуркинье есть исследование [101] показавшее, что в клетке с двумя различными ядрами — гетерокарионе: нейрон Пуркинье — VMDC происходит репрограммирование ядра VMDC. Оно увеличивается в размере, в нем становится больше дисперсного хроматина и активируется специфичный для нейронов Пуркинье трансген. Число гетерокарионов увеличивалось по мере старения животных. Увеличение у старых животных числа двухъядерных, способных к большей функциональной нагрузке [39] нейронов указывает роль слияния клеток в регенерации. Регенераторное значение слияний можно предполагать и по результатам работы Johansson с соавторами [47], обнаруживших, увеличение числа тех же гетерокарионов (нейрон Пуркинье — VMDC) при хроническом воспалении у мышей-реципиентов. Понятно, что схема регенерации мозга, основанная на результатах трансгенных трансплантаций, имеет очень шаткое основание. В ней много слабых пунктов.

1. Все результаты получены в трансгенных экспериментах, резко меняющих состояние животных (облучение в летальной дозе, большие дозы иммунодепрессантов);

2. Низкое число слияний (1—2 на 10^6 просмотренных клеток). Маловероятно, чтобы столь редкое событие оказывало репаративное действие;

3. В слияниях участвуют только донорские костномозговые клетки. Роль стволовых клеток мозга или любых других эндогенных клеток невыяснена. Наверняка стволовые клетки реципиента репрессированы, если не уничтожены облучением;

4. Облучение нарушает гематоэнцефалический барьер [30, 85], поэтому нельзя отвергнуть предположение, что костномозговые клетки проникли в мозг благодаря облучению, а у интактных животных проникновение невозможно;

5. Слияния происходят только с клетками Пуркинье, но не с другими видами нейронов. Таким образом, регенеративная роль слияний предполагалась только для одного вида нейронов мозжечка, а не для всех нейронов мозга.

И всё же в проблеме регенерации ЦНС трансгенные эксперименты имеют большое значение. Они испытывали ещё одним методом существование нейрогенеза. Не доказав его, они способствовали кру-

шению догмы о том, что пролиферация клеток единственная форма регенерации. Более того, трансгенные эксперименты открыли альтернативу нейрогенеза — слияние клеток. Скорее всего, слияние, выявляемое в трансгенном эксперименте, не существует в природе — слишком искусственны условия его возникновения. Но раз оно, хотя бы в экзотических условиях, созданных человеком, случается в организме, значит, какая-то биологическая подкладка под ним есть и этот феномен достоин обдумывания и исследования.

Возможно, такого рода мысли натолкнули сотрудников НИИОПП РАМН на внимательное исследование случаев, когда в срезах, окрашенных по Ниссию, ядра нейрона и олигодендроцита кажутся находящимися в одной цитоплазме. Конечно, такое расположение ядер видели все, рассматривавшие срезы мозга в микроскопе. Внимания на этот факт не обращали, по-видимому, считая его, совершенно справедливо, эффектом наложения. Так оно и бывает в действительности, но не во всех случаях. Наложение, т.е. кажущееся расположение на одном уровне структур, находящихся в срезе на разной глубине, обычно обнаруживается при перемещении микровинтом фокальной плоскости изображения. Но, иногда, таким приемом не удается обнаружить, что ядра находятся в разных клетках. Понятно, что и в этом случае нельзя быть уверенным в действительном расположении ядер в общей цитоплазме. Выраженность наложения определяется соотношением величины структуры и толщины среза. В толстом (порядка 10 мкм) парафиновом или криостатном срезе возможны ситуации когда «горбушка» ядра олигодендроцита (диаметр 7—10 мкм), срезанная по верхней или нижней плоскости среза, занимает в нем лишь часть глубины. Если в таком срезе ядро нейрона (диаметр 10—30 мкм) занимает всю толщину среза, то все равно нейрон и олигодендроцит оказываются на разной глубине. Различие может быть и большим, если и нейрон представлен в срезе «горбушкой», а это в десятимикронном срезе возможно. Из таких рассуждений вытекает способ снизить и устранить возможность наложения — уменьшить толщину среза. Исследователи стали заливать образцы в эпоксидную смолу и анализировать полутонкие (1 мкм) и электронно-микроскопические (50—70 нм) срезы. Даже в полутонком срезе исключается вероятность расположения ядер нейрона и олигодендроцита на разных глубинах. Об электронно-микроскопическом и писать нет нужды. И в полутонких, и в электронно-микроскопических срезах обнаруживали гетерокарионы, т.е. клетки с двумя различными ядрами: нейрона и олигодендроцита. Так, учеными НИИОПП была доказана реальность слияний региональных клеток мозга [1, 5, 6, 61].

В обсуждаемой работе было обнаружено новое биологическое явление — естественное образование гетерокарионов нормальных клеток в организме. Давно известны гетерокарионы, созданные искусственно в культуре [7, 12]. Этот методический прием дал возможность многое узнать о работе генома. Гетерокарион лимфоцит-клетка миеломы был использован для создания гибридомы и производства моноклональных антител [56]. Известна способность раковых клеток объединяться в гетерокарионы [3]. О возможности естественного, представляющего собою один из механизмов онтогенеза, образования гетерокарионов нормальных соматических клеток не знали до упомянутых публикаций НИИОПП. В гетерокарионе нейрон-олигодендроцит ядро олигодендроцита становится постепенно всё более похожим морфологически на ядро нейрона по величине, форме, строению хроматина, в ядре олигодендроцита появляется ядрышко. Происходит нейрон-специфическое репрограммирование ядра олигодендроцита. По завершении процесса репрограммирования ядра становятся неразличимыми. Гетерокарион превращается в клетку с двумя одинаковыми ядрами: дикарион. Иными словами в результате слияния и репрограммирования в нейроне появляется второе нейрональное ядро, второй геном. Нейрональный геном осуществляет нейрональную функцию. Таким образом, за счет дикарионов возрастает суммарный объем функции, выполняемой популяцией нейронов. Это может компенсировать утрату части нейронов в нормальном онтогенезе или при болезни. Авторы первых публикаций по слиянию клеток мозга [5, 6, 61] указывают на увеличение числа двухъядерных клеток в префронтальной коре при ишемическом инсульте. Инсульт они вызывали методом фототромбоза [100]. Таким образом, на регенераторную роль слияний в анализируемой литературе указывают два факта:

1. Репрограммирование ядра олигодендроцита, приводящее к удвоению функционального потенциала клетки;
2. Увеличение числа слияний в коре, окружающей зону инсульта, т.е. при репаративной регенерации.

В последних публикациях нашей лаборатории приводятся доказательства регенерации коры путем слияния клеток и образования дополнительных геномов при геморрагическом инсульте [79] и при действии гипоксии [78].

Итак, в современной литературе описывались четыре механизма регенерации нервной ткани мозга:

- 1 — нейрогенез;
- 2 — внутриклеточная регенерация;
- 3 — слияние BMDC с нейронами Пуркинью в трансгенном эксперименте;
- 4 — слияние региональных клеток коры.

Сегодня учение о нейрогенезе сохраняет актуальность и интенсивно развивается. 15.04.2014 на запрос «нейрогенез у взрослых млекопитающих» PubMed выдал 5066 публикаций. В качестве подтверждения актуальности проблемы указываем, что, например, статья F.H. Gage (Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000, Vol. 287(5457), P. 1433—1438) по состоянию на 10.04.2014 была цитирована 4284 раза (Sci-Hub). Однако в этом стремительном развитии обозначились признаки кризиса, суть которого — отсутствие или низкая эффективность клеточной терапии. В настоящее время в журнале *Frontiers in Neurosciences* развернуто обсуждение этой проблемы под лозунгом: «Adult neurogenesis twenty years later: physiological function versus brain repair». Очевидно, что все эти события естественны для развития нового научного направления. Накопленные знания о нейрогенезе обогащают теорию медицины и, несомненно, выразятся в совершенствовании лечения. Не следует забывать, в то же время, что сфера нейрогенеза ограничена небольшим участком мозга, и необходимость знаний механизмов регенерации нейронов на остальной территории мозга не уменьшилась достижениями в этой сфере.

Второй, а точнее, самый первый, самый общий и фундаментальный механизм регенерации — внутриклеточная регенерация, суть которой сформулировал Д.С. Саркисов. Этот механизм и интенсивно исследуется и широко используется для врачебного вмешательства. Можно уверенно сказать, что большая часть лекарственных, физиотерапевтических, психотерапевтических воздействий опосредуется через этот путь регенерации. Новые знания о молекулярных превращениях в здоровом и больном мозге есть развитие представлений о внутриклеточной регенерации.

Третий механизм регенерации — слияние BMDC с нейронами Пуркинью в трансгенном эксперименте, скорее всего не имеет места за пределами научного эксперимента. Тем не менее, полученные на этом направлении знания оказались полезными, введя феномен слияния клеток в область интереса людей, занимающихся регенерацией мозга.

Четвертый механизм — слияние региональных клеток мозга репрограммирование ядер и образование двухъядерных нейронов. Мы не знаем, насколько распространен в мозге феномен слияния нейронов с олигодендроцитами. Уже имеющиеся результаты дают основания полагать, что, по крайней мере, в коре большого мозга физиологическая и репаративная регенерация нейронов осуществляется путем слияния их с олигодендроцитами и последующего репрограммирования ядер олигодендроцитов. Есть весомые доказательства реальности этого механизма регенерации [5, 6, 78, 79]. Необычность такого способа реге-

нерации, его несходство с уже известными, значимость для биологии вообще и неврологии, в частности, неясность многих деталей — обуславливают необходимость дальнейшего разностороннего изучения регенерации нейронов путем слияния клеток.

Список литературы

1. Комиссарова С.В., Турыгина С.А., Александрин В.В. Модель очага воспаления в коре мозга у крыс. *Патогенез*. 2011; 9 (1): 38—42.
2. Максимов А.А. *Учение о тканях*. СПб., 1915; С. 614.
3. Наперстников В.В., Доросевич А.Е. Соматическая гибридизация клеток при раке как один из механизмов, объясняющих несостоятельность иммунологического надзора. *Архив патологии*. 1986; 6: 83—7.
4. Огнев И.Ф. *Курс нормальной гистологии*. Часть 1, 2-е издание. М., 1908.
5. Пальцын А.А., Колокольчикова Е.Г., Константинова Н.Б. и др. Образование гетерокарионов как способ регенерации нейронов при постишемическом повреждении коры мозга крыс. *Бюллетень эксперимент. биологии и медицины*. 2008; 10: 467—70.
6. Пальцын А.А., Константинова Н.Б., Романова Г.А. и др. Роль слияния клеток в физиологической и репаративной регенерации коры головного мозга. *БЭБиМ*. 2009; 11: 580—3.
7. Рингерц Н., Сэвидж Р. *Гибридные клетки*. М., 1979.
8. Саркисов Д.С. О формах регенераторной реакции. *Экспериментальная хирургия и анестезиология*. 1962; 2: 3—7.
9. Саркисов Д.С. *Регенерация и её клиническое значение*. М., 1970; С.284.
10. Саркисов Д.С. *Очерки истории общей патологии*. М.: Медицина, 1993.
11. Саркисов Д.С., Пальцын А.А., Втюрин Б.В. *Электронно-микроскопическая радиоавтография клетки*. М., 1980; С.264.
12. Харрис Г. *Ядро и цитоплазма*. М.: Мир. 1973; 188.
13. Улумбеков Э.Г., Челышев Ю.А. (ред.), Бойчук Н.В. и др. *Гистология*, изд. 2-е. М.: ГЭОТАР, МЕД, 2001.
14. Ackman J.B., Siddiqi F., Walikonis R.S. et al. Fusion of microglia with pyramidal neurons after retroviral infection. *J. Neurosci*. 2006; 26 (44): 11413—22.
15. Altman J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*. 1962; 135: 1127—8.
16. Altman J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *The Anatomical record*. 1963; 145 (4): 573—91.
17. Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *The Journal of Comparative Neurology*. 1969; 137 (4): 433—57.
18. Altman J., Das G.D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol*. 1962; 124: 319—36.
19. Alvarez-Dolado M., Pardal R., Garcia-Verdugo J.M. et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*. 2003; 425 (6961): 968—73.
20. Baumann N., Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev*. 2001; 81: 871—927.
21. Bhardwaj R.D., Curtis M.A., Spalding K.L. et al. Neocortical neurogenesis in humans is restricted to development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103: 12564—8.
22. Brazelton T.R., Rossi F.M., Keshet G.J., Blau H.M. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*. 2000; 290: 1775—9.
23. Carmichael S.T. Themes and Strategies for Studying the Biology of Stroke Recovery in the Post-Stroke Epoch. *Stroke*. 2008; 39 (4): 1380—8.
24. Carmichael S.T., Chesselet M.F. Synchronous neuronal activity is signal for axonal sprouting after cortical lesions in the adult. *J. Neurosci*. 2002; 22: 6062—70.
25. Carmichael S.T., Wei L., Rovainen C.M., Woolsey T.A. New patterns of intra-cortical connections after focal stroke. *Neurobiol. Dis*. 2001; 8: 910—22.
26. Collarini E.J., Pringle N., Mudhar H. et al. Growth factors and transcription factors in oligodendrocyte development. *J. Cell Sci. Suppl*. 1991; 5: 117—23.
27. Corotro F.S., Henegar J.R., Maruniak J.A. Odor deprivation leads to reduced neurogenesis and reduced neuronal survival in the olfactory bulb of the adult mouse. *Neuroscience*. 1994; 61: 739—44.
28. Curtis M.A., Faull R.L., Eriksson P.S. The effect of neurodegenerative diseases on the subventricular zone. *Nat. Rev. Neurosci*. 2007; 8 (9): 712—23.
29. Dancause N., Barbay S., Frost S.B. et al. Extensive cortical rewiring after brain injury. *J. Neurosci*. 2005; 2: 10167—9.
30. Davoust N, Vuillat C, Androdias G, Nataf S. From bone marrow to microglia: barriers and avenues. *Trends. Immunol*. 2008; 29: 227—34.
31. Dayer A.G., Cleaver K.M., Abouantoun T., Cameron H.A. New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *J. Cell Biol*. 2005; 168: 415—27.
32. Doetsch F., Caille L., Lim D.A. et al. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*. 1999; 97: 703—16.
33. Duque A., Rakic P. Different effects of bromodeoxyuridine and [³H]thymidine incorporation into DNA on cell proliferation, position, and fate. *J. Neurosci*. 2011; 31 (42): 15205—17.
34. Ehninger D., Kempermann G. Regional effects of wheel running and environmental enrichment on cell genesis and microglia proliferation in the adult murine neocortex. *Cereb. Cortex*. 2003; 13: 845—51.
35. Eriksson P.S., Perfilieva E., Bjork-Eriksson et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med*. 1998; 11: 1313—7.
36. Gould E. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat. Rev. Neurosci*. 2007. 8 (6): 481—8.
37. Gould E., Reeves A.J., Fallah M. et al. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96: 5263—7.
38. Gould E., Reeves A.J., Graziano M.S.A., Gross C.G. Neurogenesis in the Neocortex of Adult Primates. *Science*. 1999; 286 (5439): 548—52.
39. Gregory T.R., Hebert P.D. The modulation of DNA content: proximate causes and ultimate consequences. *Genome Res*. 1999; 9 (4): 317—24.
40. Gussoni E., Bennett R.R., Muskiewicz K.R. et al. Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *J. Clin. Invest*. 2002; 110 (6): 807—14.

41. Hayashi T., Noshita N., Sugawara T., Chan P.H. Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 2003; 23: 166–80.
42. Itoh T., Satou T., Takemori K. et al. Neural Stem Cells and New Neurons in the Cerebral Cortex of Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats After Stroke. *J. Mol. Neurosci.* 2010; 41: 55–65.
43. Jacobs K.M., Donoghue J.P. Reshaping the cortical motor map by unmasking latent intracortical connections. *Science.* 1991; 251: 944–7.
44. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002; 418(6893): 41–9.
45. Jiang W., Gu W.G., Brannstrom T. et al. Wester Cortical Neurogenesis in Adult Rats After Transient Middle Cerebral Artery Occlusion. *Stroke.* 2001; 32: 1201–7.
46. Johansson C.B., Momma S., Clarke D.L. et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell.* 1999; 96: 25–34.
47. Johansson C.B., Youssef S., Kolekar K. et al. Extensive fusion of haematopoietic cells with Purkinje neurons in response to chronic inflammation. *Nature cell biology.* 2008; 10: 575–83.
48. Kameda M., Shingo T., Takahashi K. et al. Adult neural stem and progenitor cells modified to secrete GDNF can protect, migrate and integrate after intracerebral transplantation in rats with transient forebrain ischemia. *European Journal of Neuroscience.* 2007; 26: 1462–78.
49. Kaplan M.S., Hinds J.W. Neurogenesis in the Adult Rat: Electron Microscopic Analysis of Light Radioautographs. *Science.* 1977; 197: 1092–4.
50. Katchanov J., Harms C., Gertz K. et al. Mild cerebral ischemia induces loss of cyclin-dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle machinery before delayed neuronal cell death. *J. Neurosci.* 2001; 21: 5045–53.
51. Kempermann G., Kuhn H.G., Gage F.H. Genetic influence in the dentate gyrus of mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997a; 94: 10409–14.
52. Kempermann G., Kuhn H.G., Gage F.H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature.* 1997b; 386: 493–5.
53. Kempermann G., Brandon E.P., Gage F.H. Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr. Biol.* 1998; 8: 939–42.
54. Kitamura T., Saitoh Y., Takashima N. et al. Adult Neurogenesis Modulates the Hippocampus-Dependent Period of Associative Fear Memory. *Cell.* 2009; 139: 814–27.
55. Kodama M., Fujioka T., Duman R.S. Chronic olanzapine or fluoxetine administration increases cell proliferation in hippocampus and prefrontal cortex of adult rat. *Biol. Psychiatry.* 2004; 56: 570–80.
56. Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975; 256 (5517): 495–7.
57. Koketsu D., Mikami A., Miyamoto Y., Hisatsune T. Nonrenewal of Neurons in the Cerebral Neocortex of Adult Macaque Monkeys. *The Journal of Neuroscience.* 2003; 23(3): 937–42.
58. Kornack D.R., Rakic P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96: 5768–73.
59. Kornack D.R., Rakic P. Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. *Science.* 2001a; 294: 2127–30.
60. Kuan C.Y., Schloemer A.J., Lu A. et al. Hypoxia-ischemia induces DNA synthesis without cell proliferation in dying neurons in adult rodent brain. *J. Neurosci.* 2004; 24: 10763–72.
61. Kubatiev A., Paltsyn A., Konstantinova N. et al. Cell Fusion and reprogramming nuclei — mechanism of regeneration of brain cortex. 6th International Congress of Pathophysiology. 2010; 183.
62. Lazarini F., Lledo P.M. Is adult neurogenesis essential for olfaction? *Trends in neurosciences.* 2011; 34: 20–30.
63. Lewis P.F., Emerman M. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 1994; 68: 510–6.
64. Lichtenwalner R.J., Parent J.M. Adult neurogenesis and the ischemic forebrain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 2006; 26: 1–20.
65. Lois C., Alvarez-Buylla A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993; 90: 2074–7.
66. Lois C., Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science.* 1994; 264: 1145–8.
67. Mezey E., Chandross K.J., Harta G. et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science.* 2000; 290: 1779–82.
68. Miller M.W., Nowakowski R.S. Use of bromodeoxyuridine immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain Res.* 1988; 457: 44–52.
69. Mirescu C., Peters J.D., Noiman L., Gould E. Sleep deprivation inhibits adult neurogenesis in the hippocampus by elevating glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103(50): 19170–5.
70. Mullen R.J., Buck C.R., Smith A.M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development.* 1992; 116: 201–11.
71. Nakagomi T., Taguchi A., Fujimori Y. et al. Isolation and characterization of neural stem/progenitor cells from post-stroke cerebral cortex in mice. *European Journal of Neuroscience.* 2009; 29: 1842–52.
72. Nowakowski R.S., Hayes N.L. New neurons: extraordinary evidence or extraordinary conclusion? *Science.* 2000; 288: 771.
73. Neves G., Cooke S.F., Bliss T.V. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: A neural network approach to causality *Nature Reviews Neuroscience.* 2008; 9(1): 65–75.
74. Ohab J.J., Fleming S., Blesch A., Carmichael S.T. A Neurovascular Niche for Neurogenesis after Stroke. *The Journal of Neuroscience.* 2006; 26 (50): 13007–16.
75. Okabe M., Ikawa M., Kominami K. et al. «Green mice» as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 1997; 407(3): 313–9.
76. Okada A., Lansford R., Weimann J.M. et al. Imaging cells in the developing nervous system with retrovirus expressing modified green fluorescent protein. *Exp. Neurol.* 1999; 156: 394–406.
77. Palmer T.D., Markakis E.A., Willhoite A.R. et al. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J. Neurosci.* 1999; 19: 8487–97.
78. Paltsyn A.A., Manukhina E.B., Goryacheva A.V. et al. Intermittent hypoxia stimulates formation of binuclear neurons in brain cortex — A role of cell fusion in neuroprotection? *Exp. Biol. Med.* 2014. [Epub ahead of print]

79. Paltsyn A., Komissarova S., Dubrovin I., Kubatiev A. Increased Cell Fusion in Cerebral Cortex May Contribute to Poststroke Regeneration. *Stroke Research and Treatment*. 2013; 16 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/869327>
80. Pereira A.C., Huddleston D.E., Brickman A.M. et al. An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007; 104(13): 5638–43.
81. Priller J., Persons D.A., Klett F.F. et al. Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *JCB*. 2001; 155(5): 733–8.
82. Reynolds B., Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992; 255 (5052): 1707–10.
83. Richards L.J., Kilpatrick T.J., Bartlett P.F. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992; 89: 8591–5.
84. Roe T., Reynolds T.C., Yu G., Brown P.O. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J*. 1993; 12: 2099–108.
85. Rubin P., Gash D.M., Hansen J.T. et al. Disruption of the blood-brain barrier as the primary effect of CNS irradiation. *Radiother. Oncol*. 1994; 31: 51–60.
86. Runyan C.A., Weickert C.S., Saunders R.C. Adult neurogenesis and immediate early gene response to working memory stimulation in the primate prefrontal cortex. *Soc. Neurosci. Abstr*. 2006; 318 (10).
87. Saino O., Taguchi A., Nakagomi T. et al. Immunodeficiency Reduces Neural stem/Progenitor Cell Apoptosis and Enhances Neurogenesis in the Cerebral Cortex After Stroke. *Journal of Neuroscience Research*. 2010; 88: 2385–97.
88. Shors T.J., Miesegaes G., Beylin A. et al. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*. 2001; 410: 372–6.
89. Simon C., Geotz M., Dimou L. Progenitors in the Adult Cerebral Cortex: Cell Cycle Properties and Regulation by Physiological Stimuli and Injury. *Glia*. 2011; 59: 869–81.
90. Snyder E.Y., Deitcher D.L., Walsh C. Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell*. 1992; 68(1): 33–51.
91. Spalding K.L., Bhardwaj R.D., Buchholz B.A. et al. Retrospective birth dating of cells in humans. *Cell*. 2005; 122: 133–43.
92. Squire L.R., Bayley P.J. The neuroscience of remote memory. *Curr. Opin. Neurobiol*. 2007; 17(2): 185–196.
93. Terada N., Hamazaki T., Oka M. et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*. 2002; 416: 542–5.
94. Thored R., Arvidsson A., Cacci E. et al. Persistent Production of Neurons from Adult Brain Stem Cells During Recovery after Stroke. *Stem Cells*. 2006; 24: 739–47.
95. Toni N., Laplagne D.A., Zhao Ch. et al. Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat. Neurosci*. 2008; 11(8): 901–7.
96. Toni N., Teng E.M., Bushong E.A. et al. Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat. Neurosci*. 2007; 10 (6): 727–34.
97. Vassilopoulos G., Wang P.-R., Russell D.W. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature*. 2003; 422: 901–4.
98. Wang J.M., Singh C., Liu L. et al. Allopregnanolone reverses neuron and cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010; 107(14): 6498–503.
99. Wang X., Willenbring H., Akkari Y. et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*. 2003; 422: 897–901.
100. Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann. Neurol*. 1985; 17: 497–504.
101. Weimann J.M., Johansson C.B., Trejo A., Blau H.M. Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. *Nat. Cell Biol*. 2003a; 5(11): 959–66.
102. Wiltgen B.J., Brown R.A.M., Talton L.E., Silva A.J. New Circuits for Old Memories: The Role of the Neocortex in Consolidation. *Neuron*. 2004; 44: 101–8.
103. Winocur G., Wojtowicz J.M., Sekeres M. et al. Inhibition of Neurogenesis Interferes With Hippocampus-Dependent Memory Function. *Hippocampus*. 2006; 16: 296–304.
104. Wojtowicz J.M., Kee N. BrdU assay for neurogenesis in rodents. *Nature Protoc*. 2006; 1: 1399–405.
105. Xue J.-H., Yanamoto H., Nakajo Y. Induced Spreading Depression Evokes Cell Division of Astrocytes in the Subpial Zone, Generating Neural Precursor-Like Cells and New Immature Neurons in the Adult Cerebral Cortex. *Stroke*. 2009; 40: e606–e613.
106. Yang Y., Geldmacher D.S., Herrup K. DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease. *J. Neurosci*. 2001; 21: 2661–8.
107. Ying Qi-L., Nichols J., Evans E.P., Smith A.G. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*. 2002; 416: 545–8.
108. Zhao Ch., Teng E.M., Summers R.G. Jr et al. Distinct Morphological Stages of Dentate Granule Neuron Maturation in the Adult Mouse Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. 2006; 2 (1): 3–11.
109. Zhang R.L., Zhang Z.G., Chopp M. Neurogenesis in the Adult Ischemic Brain: Generation, Migration, Survival, and Restorative Therapy. *Neuroscientist*. 2005; 11: 408–16.

Поступила 28.04.14
Received 28.04.14

Сведения об авторах:

Дубровин И.П. (Dubrovin I.P.) — науч. сотр. лаб. регуляции репаративных процессов ФГБУ НИИОПП РАМН
Пальцын А.А. (Paltsyn A.A.) — д.биол.наук, зав. лаб. регуляции репаративных процессов ФГБУ НИИОПП РАМН; проф. каф. общей патологии и патофизиологии ГБОУ ДПО РМАПО

Селиванова А.В.^{1,2}, Марченков Ю.В.^{1,3}

Патофизиологические аспекты изменения обмена веществ у пациентов с тяжелой механической травмой

¹ — ГКБ им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения, Москва, 2-й Боткинский проезд, 5

² — НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

³ — НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского РАМН, Москва, ул. Петровка, 25, стр. 2

В обзоре представлен современный взгляд на проблему каскада патофизиологических реакций у пациентов с тяжелой механической травмой. В статье детально рассмотрены изменения гормонально-метаболических параметров у указанной категории пациентов. Показано, что в тяжелых случаях развивается синдром гиперметаболизма- гиперкатаболизма, при котором наблюдается резистентность к экзогенному введению питательных веществ. Синдрому гиперметаболизма-гиперкатаболизма отводится ведущая роль в патогенезе критического состояния, его течение во-многом определяет исход всего заболевания. В статье рассмотрен патогенез патофизиологической цепи, происходящих у тяжелобольных пациентов изменений. Обсуждается возможность поиска путей оптимизации терапии пациентов с тяжелой механической травмой.

Ключевые слова: критическое состояние, политравма, синдром гиперметаболизма-гиперкатаболизма

Selivanova A.V.^{1,2}, Marchenkov Yu.V.^{1,3}

Pathophysiological aspects of changing of metabolism in patients with severe mechanical trauma

¹ — City Clinical Hospital of Botkin, Moscow, Russia, 2-St Botkinsky proezd, 5, tel.: 8-495-945-0045

² — Institute of General pathology and pathophysiology RAMN, Moscow, the Baltic Street, 8, tel.: 8-499-151-1756)

³ — Institute of General Reanimatology of Negovskogo, Moscow, Petrovka street 25/2, tel.: 8-495-694-27-08

The review presents contemporary look at the problem of the cascade of pathophysiological reactions in patients with severe mechanical trauma. In the article described in detail changes hormonal and metabolic parameters in this category patients. In severe cases this leads to the development of the syndrome of hypermetabolism-hypercatabolism. Patients with this syndrome have a resistance to the introduction of exogenous nutrients. Syndrome of hypermetabolism-hypercatabolism play a leading role in the pathogenesis of critical condition, it determines the outcome of the disease in general. The article studied in detail the pathogenesis of the processes occurring in critically ill patients, taking into account the pathogenetic mechanism of development are possible solutions to this complex issue.

Key words: critical condition, polytrauma, syndrome of hypermetabolism-hypercatabolism

В последние десятилетия резко возросла частота и тяжесть сочетанных травм. Причем особое беспокойство вызывает не просто рост травматизма, а то обстоятельство, что имеется рост травматизма со смертельным исходом, с переходом на инвалидность, с длительной утратой трудоспособности. Также идет увеличение количества травм, при которых имеется несколько повреждений, а тяжесть функционального ответа организма на эти повреждения значительно превышают ожидаемую в соответствии со сложившимися представлениями о тяжести каждого из этих повреждений или даже их суммы. Особого внимания требует ситуация, когда ни

одно из повреждений не сопряжено с непосредственной угрозой для жизни, а в совокупности они вызывают такую угрозу.

Концепция критического состояния травматической болезни предполагает изучение и оценку всего комплекса явлений, возникающих при тяжелых механических повреждениях организма в неотрывной связи с реакциями приспособительного, адаптивного характера в их сложных взаимосвязях на всех этапах болезни — с момента травмы и до ее исхода: выздоровления (полного или неполного) или гибели.

Установлено, что политравма характеризуется снижением индекса гормональной адаптации, что свидетельствует о развитии «синдрома функциональной недостаточности эндокринной системы» и дезадаптивном варианте течения посттравматического периода [1, 2]. При травматической болезни в организме развиваются глубокие на-

Для корреспонденции: Селиванова Анна Владимировна, к.м.н., ГКБ им. Боткина, консультативно-диагностическая поликлиника, терапевтическое отделение, врач-эндокринолог; ведущий научный сотрудник НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, лаборатория клеточной рецепции, e-mail: best4000@list.ru

рушения функционирования центральной нервной, иммунной и эндокринной системы на всех уровнях внутрисистемной (молекулярный, ультраструктурный, клеточный, органный) и межсистемной интеграции. Выявлено, что важнейшее патогенетическое значение в формировании патологии системы иммунитета при травматической болезни имеют расстройства гормональной регуляции. Показано, что посттравматическое повреждение головного мозга сопровождается разнонаправленными изменениями содержания в крови пролактина, адренкортикотропного, тиреотропного гормонов, кортикостерона, трийодтиронина, тироксина [3, 4]. Все это приводит к усугублению критического состояния пациента.

Высокая смертность при механической травме обусловлена развитием критического состояния, при котором развивается синдром гиперметаболизма- гиперкатаболизма, т.е. состояние, когда имеется резистентность к экзогенному введению питательных веществ. Синдрому гиперметаболизма отводится ведущая роль в патогенезе критических состояний и органный дисфункции. Его течение, коррекция или прогрессирование определяют исходы, как критического состояния, так и полиорганной недостаточности. При синдроме «гиперметаболизма-гиперкатаболизма» нарушаются все виды основного обмена [5], а именно:

- Изменения в белковом обмене:
 - перераспределение протеинов на глюконеогенез;
 - синтез острофазных белков, цитокинов;
 - несмотря на повышенный синтез белка, преобладает распад белковых субстанций (катаболизм) — отрицательный азотистый баланс.
- Изменения в углеводном обмене:
 - толерантность клеток периферических тканей к инсулину и глюкозе;
 - скорость продукции глюкозы гепатоцитами возрастает с 2,5 до 4,4—5,1 мг/кг/мин;
 - мобилизация аминокислот из миоцитов скелетной мускулатуры и висцеральных клеток на глюконеогенез;
 - сочетание толерантности периферических тканей к глюкозе и активного глюконеогенеза.
- Изменения в жировой обмене:
 - активация липолиза;
 - сниженная утилизация жирных кислот и триглицеридов тканями;
 - снижение активности липопротеинлипазы.

Таким образом, метаболические изменения при тяжелой механической травме являются компенсаторными, но в последующем приобретают патологический характер. Вследствие этого, гиперметаболизм — это грубая дисрегуляторная патология, при которой наряду с нарушением транспорта кислорода происходит нарушение доступности субстратов для окисления, что сопровождается активацией глюконеогенеза, нарушения-

ми белкового, жирового обмена и углеводного обмена [6, 7]. Гиперметаболическая полиорганная недостаточность может возникнуть под воздействием любого этиологического фактора — острой кровопотери, сепсиса, политравмы, ишемии, тяжелого воспалительного процесса (острый панкреатит), но особенно часто встречается при тяжелой механической травме.

Необходимо учитывать, что адаптационные механизмы служат для выживания организма в условиях критического состояния [8]. Поскольку глюкоза является основным питательным элементом для большинства органов и тканей, то эти адаптационные механизмы направлены, прежде всего, на поддержание достаточного уровня гликемии. Это достигается путем взаимодействия многочисленных метаболических путей, связывающие гликолиз, гликогенолиз, глюконеогенез, циклы Кори, Варбурга, Робертса, Коупа и т.д.

Гипергликемия отнюдь не означает достаточного запаса глюкозы в организме, а свидетельствует о высокой потребности в энергетическом субстрате в основном глюкозозависимых тканей и является следствием активизации неоглюкогенеза и перераспределения ее утилизации.

Развитие критического состояния приводит к выраженному нейроэндокринному ответу [9—11]. Он подразделяется на контролируемые гипоталамо-гипофизарной системой и контролируемые автономной нервной системой. Секретция кортизола, тироксина, гормона роста и вазопрессина контролируется гипоталамо-гипофизарной системой, а инсулина, глюкагона и катехоламинов — автономной нервной системой.

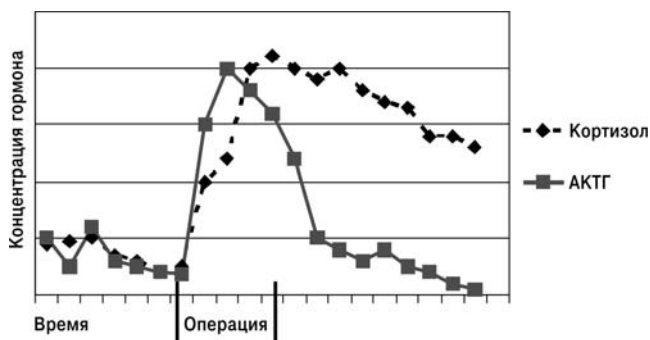
В связи со сложностью метаболической коррекции осложнений синдрома гиперметаболизма-гиперкатаболизма актуальным является вопрос о более детальном изучении патогенетических механизмов этого синдрома. Одним из проявлений метаболической реакции на стресс является значительные изменения в нейроэндокринной регуляции [12, 13]. В частности, к изменению гипоталамус-гипофиз-надпочечниковой системы, что вносит существенный вклад в патогенез критических состояний. Отличительной особенностью этих изменений является резкое повышение уровня глюкокортикоидов, что является одним из механизмов адаптации организма к стрессу, кровопотере, борьбы с шоком и последствиями травмы. Повышенная концентрация ГК вносит значительный вклад в повышение артериального давления, увеличение чувствительности миокарда и стенок сосудов к катехоламинам. Кроме того, глюкокортикоиды также стимулируют эритропоэз в костном мозге, что способствует более быстрому восполнению кровопотери. Все эти механизмы являются адаптационными для выживания организма в стрессовой ситуации, при кровопотере и при тяжелой механической травме. Наряду с повышением, происходит и изменение суточного ритма секреции гормонов. В некоторых исследованиях [14, 15] бы-

ло обнаружено подобие суточного ритма секреции кортизола, но на более высоких значениях. Более тщательное исследование ритма секреции кортизола и адreno-кортикотропного гормона (АКТГ) за день до операции и спустя 7 дней после, показало, что в первые 48 ч происходит одновременное повышение и АКТГ и кортизола, но спустя 48 ч уровень АКТГ снижается, а концентрация кортизола остается повышенной. Этот результат подтверждает гипотезу, что спустя 2 сут. после операции включается механизм АКТГ-независимой стимуляции секреции кортизола (возможно посредством действия интерлейкинов). Схематически изменения уровня кортизола и АКТГ в течении периоперационного периода представлено на рисунке.

Таким образом, благодаря АКТГ-независимой стимуляции кортизола, поддерживается повышенный уровень ГК и по механизму отрицательной обратной связи происходит снижение концентрации АКТГ и кортикотропин-рилизинг гормона. Кроме того, другие факторы способствуют снижению уровня АКТГ (эндотелин 1 и предсердный натрий-уретический фактор), которые повышаются в стрессовой ситуации [8, 14].

Повышенный уровень кортизола приводит к снижению концентрации альдостерона, так как кортизол обладает небольшой минералкортикоидной активностью, что влечет за собой снижение эндогенной продукции минералкортикоидов. Кроме того, при тяжелых заболеваниях происходит повышение предсердного натрий-уретического пептида, который напрямую ингибирует секрецию альдостерона. В эксперименте после введения синтетического АКТГ у тяжелобольных не происходит достаточного подъема уровня альдостерона, как это бывает в норме, но происходит повышение концентрации ренина, то есть развивается гиперренинемический гипоальдостеронизм. Выраженность этого синдрома (гиперренинемического гипоальдостеронизма) прямо коррелирует со смертностью пациентов.

Посттравматическое повышение уровня глюкокортикоидов имеет и свое отрицательное действие на метаболизм пациентов, находящихся в критическом состоянии. Это проявляется в усиленном глюконеогенезе, гипергли-



Изменения концентрации кортизола и АКТГ в течении периоперационного периода.

кемии, повышении катаболических процессов, вызывающих гипопроотеинемию, гипоальбуминемию, липолиз, а также супрессии тиреоидных гормонов, гормона роста и половых гормонов. Указанные последствия повышения уровня ГК вносят значительный вклад в развитие синдрома «гиперметаболизма-гиперкатаболизма».

Медиаторная система в патогенезе критических состояний

В развитии критического состояния, характеризующегося дезинтеграцией функций органов, определяющее значение отводят универсальному патологическому процессу — развитию системного воспалительного ответа (СВО) [6, 7]. При этом учитывается не только роль «агрессивной» инфекции, как пускового механизма СВО, но и других экстремальных факторов, сопровождающих критическое состояние при шоках, ожогах, травме. Ключевые медиаторы системного воспалительного ответа, взаимодействуя между собой, создают гуморальный фон, определяющий выраженность и течение клинико-лабораторной картины системной воспалительной реакции и критического состояния в целом. При этом как провоспалительные, так и противовоспалительные цитокины оказывают разнообразные и принципиально важные воздействия на большинство органных систем организма в условиях критического состояния. Существующие в настоящее время критерии СВО (определенные уровни тахикардии, тахипноэ, лейкоцитоза, температуры тела) являются по сути суррогатными признаками СВР и далеко не в полной мере характеризуют СВР как ключевой фактор системного воспаления. Проблема идентификации и количественной оценки СВР в целях обеспечения принятия клинического решения является весьма актуальной и злободневной. Среди цитокинов ведущая роль отводится фактору некроза опухолей- α (ФНО- α), интерлейкину-1 (ИЛ-1) и интерлейкину-6 (ИЛ-6).

Производство цитокинов носит активационный характер и обеспечивает информационный обмен между клетками, вовлеченными в воспалительный процесс. При протективных вариантах воспалительного процесса цитокины преимущественно образуются в очаге воспаления, а их поступление в системный кровоток обуславливает длительнодействующие эффекты: острофазный ответ, стресс-реакцию нейроэндокринной системы, лихорадку, лейкоцитоз и т.д. [9, 16, 17].

Именно цитокины являются медиаторами первого ряда, которые сами способны вызывать каскады гуморальных реакций. Постулируется, что высокое содержание провоспалительных цитокинов в сыворотке крови является маркером выраженности воспалительной реакции и повышенной секреторной способности фагоцитирующих клеток, участвующих в формировании системного воспалительного ответа и полиорганной недостаточности при травматическом повреждении.

Изменения соматотропной оси в критическом состоянии

Во время развития травматической болезни у пациентов с тяжелой механической травмой происходят значительные изменения и в соматотропной оси, что также вносит значительный вклад в усугубление критического состояния больного [18, 19]. Уже с первых часов острой фазы критического состояния уровень гормона роста (ГР) значительно возрастает. У здоровых людей секреция ГР происходит периодически, что обуславливает существенное колебание уровня ГР в плазме. В течение суток обычно бывает около 5 пиков с повышением уровня ГР до от 5 до 45 нг/мл. В острой фазе критического состояния концентрация ГР повышена, а уровни инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1) и белков-переносчиков ИФР-1 снижены. Причины, по которым происходят эти изменения, остаются невыясненными. По одной гипотезе, это происходит вследствие формирования резистентности периферических тканей к гормону роста. Возможно, это адаптивный механизм для уменьшения метаболических потребностей клеток во время стресса. По другой, — цитокины (ФНО- α , интерлейкин-1,6) угнетают экспрессию рецепторов ГР в тканях, что приводит к уменьшению синтеза ИФР-1 и, по принципу обратной связи, к значительному повышению синтеза ГР. За счет прямого воздействия ГР развиваются липолиз, резистентность к инсулину и стимуляция иммунного ответа. При этом отсутствуют не прямые эффекты ГР, опосредуемые ИФР-1. Следует отметить, что при неадекватно высоком уровне ГР в острой фазе критического состояния, когда он превышает 9 нг/мл, исходы ухудшаются.

Если критическое состояние продолжается более недели, то формируется хроническая фаза критического состояния. Нейроэндокринологически она характеризуется, в частности, снижением уровня ГР. Пульсативный характер изменения уровня ГР сохраняется, но пики существенно уплощаются или исчезают вовсе. Средние значения ГР составляют около 1 нг/мл, а пики не превышают 2 нг/мл. Уровни ИФР-1 и белков-переносчиков остаются низкими. Эти изменения вместе с характерным для критического состояния катаболизмом однозначно свидетельствуют о наличии соматотропной недостаточности.

На основании представленных данных возникло предположение о возможности использования терапии гормоном роста у пациентов с тяжелой механической травмой. Этот вид гормональной терапии основан, прежде всего на метаболических эффектах гормона роста, которые заключаются в:

1. Уменьшении распада белка, что способствует снижению интенсивности потери веса при синдроме гиперметаболизма-гиперкатаболизма;
2. Повышении проницаемости клеточных мембран для аминокислот;
3. Стимулировании распада гликогена;

4. Повышении секреции инсулина;

5. Мобилизации глюкозы и жиров в качестве источника энергии с сохранением аминокислот для белкового синтеза.

В настоящее время в зарубежной литературе стали появляться работы по применению гормона роста у пациентов реанимационного профиля. Авторы отмечают, что терапия ГР оправдана только в хронической фазе критического состояния, тогда как в острой фазе ГР может оказаться действительно опасным. Последними работами было подтверждено, что ГР вызывает гипергликемию. Однако, если удавалось контролировать уровень глюкозы, то результаты лечения не ухудшались.

Таким образом, используя гормон роста, мы вправе рассчитывать на нормализацию белкового обмена, а также на вторичные метаболические изменения, которые происходят вслед за стабилизацией азотистого баланса.

Однако внедрение этого направления в практическую деятельность требует подробных исследований в области патогенеза критических состояний и поиск возможных путей оптимизации терапии пациентов с тяжелой механической травмой. Этот вид метаболической терапии, возможно, даст ключ к патогенетическому лечению осложнений синдрома гиперметаболизма. Ведь воздействие на причину патофизиологических изменений всегда более выгодно (как с лечебной, так и с экономической точки зрения), чем посимптомное лечение различных проявлений одного патофизиологического механизма. Поэтому несомненные достижения отечественной и зарубежной медицины в детальном изучении каскада патофизиологических реакций при травматической болезни способствуют улучшению результатов лечения, что позволит разработать принципиально новые подходы к лечению тяжело пострадавших.

Список литературы

1. Крыжановский Г.Н., Акмаев И.Г., Магаева С.В., Морозов С.Г. *Нейроиммуноэндокринные взаимодействия в норме и патологии*. М.: Медицинская книга, 2010. 288 с.
2. Попугаев К.А., Савин И.А. Соматотропная недостаточность и применение гормона роста в интенсивной терапии. Обзор литературы. *Вестник анестезиологии и реаниматологии*. 2011; 8 (1): 29—35.
3. Кудлай Д.А. *Иммунометаболические аспекты патогенеза политравмы*: Автореф. дисс. на соискание учёной степени д.м.н. Новосибирск, 2007.
4. Williams Marc G., Felicia N. Jeschke David L. Chink Modulation of the Hypermetabolic Response to Trauma: Temperature, Nutrition, and Drugs. *Journal of the American College of Surgeons*. 2009; Vol. 208, Issue 4: P. 489—502.
5. Завертайло Л.Л. *Основные закономерности развития расстройств энергетического и белкового обмена у больных с острой церебральной недостаточностью на продленной искусственной вентиляции легких и методы их коррекции*: Автореф. дисс. на соискание учёной степени к.м.н. Екатеринбург, 2011.
6. Гусев Е.Ю., Черешнев В.А. Системное воспаление: теоретические и методологические подходы к описанию модели общепатологического процесса. Часть 2.

Эволюционные аспекты. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2013; 1: 3—14.

7. Гусев Е.Ю., Черешнев В.А. Системное воспаление: теоретические и методологические подходы к описанию модели общепатологического процесса. Часть 3. Предпосылки несиндромального подхода. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2013; 3: 3—14.

8. Крыжановский Г.Н., Магаева С.В. Патопфизиология нейроиммунных взаимодействий. *Патогенез*. 2010. — Т. 8, №1. — С. 4—9.

9. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И., Сукоян Г.В. Новое о сигнальных механизмах адаптации к гипоксии и их роли в системной регуляции. *Патогенез*. 2011, №3.

10. Магаева С.В. Болезни нейроиммунорегуляции. *Патогенез*. 2012; (3): 4—10.

11. Смирнов А.Н. *Элементы эндокринной регуляции: Научное издание* / Под ред. акад. РАМН В.А. Ткачука. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 352 с.

12. Пшеничкова М.Г. Устойчивость к повреждающим воздействиям и защитные эффекты адаптации у животных разных генетических линий. *Патогенез*. 2012; 1: 20—6.

13. Столяров И.Д., Петров А.М., Ивашкова Е.В., Воитицева М.В., Никифорова И.Г. Теоретические и клинические исследования в нейроиммунологии. *Патогенез*. 2012; 3: 11—7.

14. Elijah I.E., Branski L.K., Finnerty C.C., Herndon D.N. The GH/IGF-1 system in critical illness. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011. Oct; 25(5): 759—67.

15. Moller N., Vendelbo M.H., Kampmann U., Christensen B., Madsen M., Norrelund H., Jorgensen J.O. Growth hormone and protein metabolism. *Clin. Nutr.* 2009. Dec; 28(6): 597—603. Epub 2009 Sep 20.

16. Мартынова Е.А. Общие представления о роли сфинголипидов в сигнальных путях апоптоза. *Патогенез*. 2012; 4: 16—28.

17. Хананашвили М.М. Теория переходного состояния между нормой и патологией // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2012. №1: 3—12.

18. High W.M. Jr, Briones-Galang M., Clark J.A., Gilkinson C., Mossberg K.A., Zgaljardic D.J., Masel B.E., Urban R.J. Effect of growth hormone replacement therapy on cognition after traumatic brain injury // *J. Neurotrauma*. 2010. — Sep; 27(9): 1565—75.

19. Kemp S.F., Frindik J.P. Emerging options in growth hormone therapy: an update // *Drug Des. Devel Ther.* 2011; 5: 411—419.

References

1. Kryzhanovskij G.N., Akmaev I.G., Magaeva S.V., Morozov S.G. *Nejroimmunojendokrinnye vzaimodejstviya v norme i patologii*. — М.: Medicinskaja kniga. 2010; 288 s. (in Russian)

2. Popugaev K.A., Savin I.A. Somatotropnaja nedostatochnost' i primeneniye gormona rosta v intensivnoj terapii. Obzor literatury. *Vestnik anesteziologii i reanimatologii*. 2011; 8 (1): 29—35. (in Russian)

3. Kudlaj D.A. *Immunometabolicheskie aspekty patogeneza politravmy* // Avtoref. Diss. Dokt. Med. Nauk. — Novosibirsk, 2007. (in Russian)

4. Williams Marc G., Felicia N. Jeschke David L. Chink Modulation of the Hypermetabolic Response to Trauma: Temperature, Nutrition, and Drugs. *Journal of the American College of Surgeons*. 2009; Vol.208, Issue 4: P. 489—502.

5. Zavertajlo L.L. *Osnovnye zakonomernosti razvitiya rassstrojstv jenergeticheskogo i belkovogo obmena u bol'nyh s ostroj cerebral'noj nedostatochnost'ju na prodlennoj iskusstvennoj ventiljacii legkih i metody ih korrekcii*: Avtoref. Diss. Kand. Med. Nauk. Ekaterinburg, 2011 (in Russian)

6. Gusev E.Ju., Chereshev V.A. Sistemnoe vospalenie: teoreticheskie i metodologicheskie podhody k opisaniju modeli obshhepatologicheskogo processa. Chast' 2. Jevoljucionnye aspekty. *Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja terapija*. 2013. №1: 3—14. (in Russian)

7. Gusev E.Ju., Chereshev V.A. Sistemnoe vospalenie: teoreticheskie i metodologicheskie podhody k opisaniju modeli obshhepatologicheskogo processa. Chast' 3. Predposylki nesindromal'nogo podhoda. *Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja terapija*. 2013; 3: 3—14. (in Russian)

8. Kryzhanovskij G.N., Magaeva S.V. Patofiziologija nejroimmunnyh vzaimodejstvij. *Patogenez*. 2010; 8 (1): 4—9. (in Russian)

9. Luk'janova L.D., Kirova Ju.I., Sukojan G.V. Novoe o signal'nyh mehanizmah adaptacii k gipoksii i ih roli v sistemnoj reguljacii. *Patogenez*. 2011, №3 (in Russian)

10. Magaeva S.V. Bolezni nejroimmunoreguljacii. *Patogenez*. 2012; 3: 4—10.

11. Smirnov A.N. *Jelementy jendokrinnaj reguljacii: nauchnoe izdanie* / Pod red. Akad. RAMN V.A. Tkachuka. — М.: GJEOTAR-Media, 2008. 352s.

12. Pshennikova M.G. Ustojchivost' k povrezhdajushhim vozdejstvijam i zashhitnye jeffekty adaptacii u zhivotnyh raznyh genetsicheskijh linij. *Patogenez*. 2012, №1: 20—26.

13. Stoljarov I.D., Petrov A.M., Ivashkova E.V., Voinceva M.V., Nikiforova I.G. Teoreticheskie i klinicheskie issledovanija v nejroimmunologii. *Patogenez*. 2012; 3: 11—7.

14. Elijah I.E., Branski L.K., Finnerty C.C., Herndon D.N. The GH/IGF-1 system in critical illness. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011; Oct; 25 (5): 759—67.

15. Moller N., Vendelbo M.H., Kampmann U., Christensen B., Madsen M., Norrelund H., Jorgensen J.O. Growth hormone and protein metabolism. *Clin. Nutr.* 2009. Dec; 28(6): 597—603. Epub 2009 Sep. 20.

16. Martynova E.A. Obshhie predstavlenija o roli sfigolipidov v signal'nyh putjah apoptoza. *Patogenez*. 2012, №4: 16—28.

17. Hananashvili M.M. Teorija perehodnogo sostojanija mezhdur normoj i patologiej. *Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja terapija*. 2012; 1: 3—12.

18. High W.M. Jr, Briones-Galang M., Clark J.A., Gilkinson C., Mossberg K.A., Zgaljardic D.J., Masel B.E., Urban R.J. Effect of growth hormone replacement therapy on cognition after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*. 2010; Sep; 27 (9): 1565—75.

19. Kemp S.F., Frindik J.P. Emerging options in growth hormone therapy: an update. *Drug. Des. Devel. Ther.* 2011; 5: 411—9.

Поступила 03.07.14
Received 03.07.14

Сведения об авторах:

Марченков Юрий Викторович (Marchenkov Yu.V.) — д.м.н., зав. отделением общей реанимации №18 Анестезиолого-реанимационного центра ГКБ им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г.Москвы; руководитель клинического отдела Института НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского» РАМН, e-mail: marchenkov@yandex.ru

Игнатьева Г.А.

Теории иммунитета: история идей и их развитие

Федеральное государственное бюджетное учреждение «ГНЦ Институт иммунологии»
Федерального медико-биологического агентства РФ, 115478, Москва, Каширское ш., 24-2

Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования
Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России,
117997, Москва, ул. Островитянова, 1

Ignatieva G.A.

Theories of immunity: history and development of ideas

Что такое «иммунитет»? Иммунитет как явление природы — это одно. Иммунитет как понятие в головах иммунологов и неиммунологов — это другое, да ещё и разное в разных головах. Но люди не только думают, но и действуют в соответствии со своими мыслями. В области иммунологии действия с самого «дня рождения» этой науки как нормативной, который наступил в последнее десятилетие XIX века, приняли характер чрезвычайно быстрого внедрения в клиническую практику. Факты из биографий и открытий первых профессиональных иммунологов — Беринга и его коллег, Эрлиха, Ру и других мы нашли в авторитетных монографиях историков науки — Т.И. Ульянкиной, Arthur M. Silverstein, Zoltan A. Nagy, J.M. Cruseand, R.E. Lewis, ссылки на которые приводим [3, 8, 14, 16]. Работы иммунологов середины XX века и более позднего времени доступны уже по их собственным публикациям, т.е. по первоисточникам.

В 1890 г. Эмиль фон Беринг и Шибасабуро Китасато в Германии и практически одновременно Д. Тиццони и Д. Каттани в Италии поставили первые опыты по иммунизации мышей столбнячным и дифтерийным инактивированными токсинами. Беринг работал военным хирургом и имел немалый опыт наблюдений за тяжелым течением раневых инфекций. Эта практика побудила его заняться научными исследованиями в области реагирования организма на инфицирование и он пришел работать в институт Инфекционных болезней Р. Коха в Берлине. К этому

времени Эмиль Ру во Франции уже показал, что патогенное действие на организм при инфицировании дифтерийной палочкой Лёффлера оказывает экзотоксин. Беринг придумал, как из дифтерийного токсина сделать нетоксичный препарат для иммунизации (обработкой йодтрихлоридом), Китасато придумал метод инактивации столбнячного токсина (прогреванием при 55°C). От иммунизированных мышей исследователи получили сыворотки крови, которые обладали лечебным действием при внутрибрюшинном введении другим животным, заражаемым одноименными патогенами. В 1891 г. коллеги Беринга Г. Гейшлер и Е. Вернике ввели антидифтерийную сыворотку лабораторных животных больному ребенку и получили положительный результат [5]. В 1894 г. Эмиль Ру и Луи Мартен предложили использовать в качестве животных для иммунизации токсинами лошадей, что существенно количественно «промотировало» фармацевтический бизнес по получению антитоксических антисывороток. В том же 1894 г. было лицензировано массовое производство лошадиной антисыворотки против дифтерийного токсина на предприятии «Farbwerke Hoechst». В 1904 г. сам Беринг, получивший в 1901 г. первую в мире Нобелевскую премию, именно за серотерапию дифтерии, основал собственное производство противодифтерийных сывороток «Behringwerke». Беринг прожил до 1917 г. За это время накопилось немало наблюдений за осложнениями серотерапии в виде сывороточной болезни и автор серотерапии призвал коллег не увлекаться таким методом лечения [3, 16]. И если в массовом масштабе серотерапию с тех пор не применяют, то в отдельных случаях поражения человека сильнодействующими токсинами ничего другого, кроме антитоксических антител пока не придумали. Сильнодействующих бактериаль-

Для корреспонденции: Игнатьева Галина Алексеевна — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России; профессор кафедры иммунологии Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова

ных экзотоксинов оказалось немного: кроме дифтерийного и столбнячного — ботулинический и токсины клостридий, вызывающих газовую гангрену.

Дальнейшее развитие науки и практики показывало и показывает, что у природного явления иммунитета есть и защитные и деструктивные проявления. Теории иммунитета и есть единственный способ сопоставления наших представлений с природной действительностью.

Латинское слово *im-munis* означает *свободный, незапятнанный, чистый, неприкосновенный*. Это привлекательные для человека качества во всех смыслах — психологическом, личностном, юридическом, биологическом, т.е. то, к чему стремится каждый человек, по крайней мере, для самого себя. Применительно к проблемам человеческих болезней этот латинский термин *im-munitas* встречается в древнегреческих и древнеримских текстах при описаниях эпидемий чумы. Таким словом называли людей, устойчивых к заражению или переболевших, но не умерших [16]. До сих пор для большинства людей слово «иммунитет» ассоциируется с защищенностью, жизнестойкостью, следовательно, многим кажется, что чем сильнее иммунитет, тем лучше.

Накопленные за последнее столетие медицинские и экспериментальные факты показывают, однако, что это не всегда так. Например, антитела против микробов и их продуктов могут вызывать разные биологические эффекты в организме:

- нейтрализовать распространение патогена по организму или нейтрализовать микробные токсины;
- проявлять некий протективный эффект, не будучи нейтрализационными;
- усиливать инфекционный процесс;
- инициировать аутоиммунное повреждение здоровых тканей;
- вызывать болезни иммунных комплексов (васкулиты, тромбозы, органную или полиорганную недостаточность);
- не проявлять видимых эффектов *in vivo* (ни защитных, ни патогенных), но определяться в иммуонализах *in vitro*.

Какой именно эффект будет преобладающим у конкретных людей в конкретных случаях, может быть выяснено только опытным путем [2].

Разобраться с тем, что такое иммунитет, помогает изучение истории идей в этой области, часто более глубоко, чем только знакомство с современной научной периодикой. Эту историю мы кратко и проанализируем, начиная с последней четверти XIX века, когда иммунология оформилась как особая медико-биологическая наука со своими терминами и методами. В эти же годы активно развивалась микробиология, благодаря усовершенствованию и доступности микро-

скопов, средств и методов окрашивания микробов и эукариотических клеток (П. Эрлих), методов выделения чистых культур микроорганизмов, фактически их клонирования, на специально разрабатываемых твердых средах *in vitro* (Р. Кох). В конце XIX века врачи идентифицировали более 35 микробов-возбудителей заразных болезней. Наиболее известные имена — Р. Кох, Ф. Нейссер, Ф. Леффлер, Э. Клебс, Т. Эшерих, Г. Хансен, Э. Ру и многие другие. Имена некоторых из них зафиксированы в названиях микроорганизмов. И в это время иммунология двигалась в значительной мере по «параллельной линии» с микробиологией. Однако отклонения от этого параллелизма начались практически в те же годы. Психологическая установка большинства людей, однако, желающих, чтобы их что-то защищало от инфекций, мешала осознать явление иммунитета за рамками реакций макроорганизма, тем более исключительно защитных, в ответ на инфекции.

Возвращаясь к теориям иммунитета, вспомним, что Эмиль фон Беринг объяснял защитное действие антитоксинов, вырабатываемых организмом в ответ на введенный токсин, тем, что антитоксины (антитела) сами разрушают токсины подобно ферментам, расщепляющим свои субстраты. Обнаруженные в XX веке моноклональные антитела с ферментативной активностью — абзимы (*abzymes*) — являются исключением и скорее указывают на возможное филогенетическое происхождение иммуноглобулинов из каких-то древних протеаз, чем актуальным объектом.

Наибольшее внимание мы уделим работам и теориям Пауля Эрлиха (Paul Ehrlich, 1854—1915 г.) [3, 7, 8, 14, 16]. С нашей, и не только с нашей точки зрения он в данном предмете мыслитель номер один и много потрудившийся экспериментатор, по образованию, как и большинство исследователей его времени, врач. Его идеи и теории нашли подтверждение в огромном фактическом материале, полученном в XX—XXI веке. Многие именитые современники, однако, его не понимали. Несмотря на это, Эрлих повезло быть «пророком в своем отечестве». Эрлих получил врачебное образование, но имел горячее желание заниматься исследовательской работой и осуществил его в 1890 г., поступив в Институт инфекционных болезней Р. Коха. За выдающиеся труды в 1898—1899 г. для Эрлиха на средства государственной казны был организован институт экспериментальной терапии во Франкфурте-на-Майне. Эрлих получил высшее должностное звание в Германии — тайного советника по медицине — *Geheime Medizinalrat* [3]. Мы перечислим дела и открытия Эрлиха, не все и кратко, но и в таком варианте его вклад в иммунологию производит фантастическое впечатление.

Для начала в 1890—1892 гг. Эрлих получил антитела к растительным токсинам — абрину и рицину, и уже этим вывел иммунологию за пределы только микробиологии. Основываясь на данных Эрлиха, Альберт Кальметт, работающий в то время в Индокитае, получил антисыворотки против змеиных ядов. И в наше время нет иных противоядий, кроме антител против белковых и иных органических токсинов растений, змей, скорпионов, ядовитых пауков, рыб, а также некоторых лекарств, например, дигоксина при передозировках.

В отличие от всех своих современников, которые полагали, что антитела появляются в организме после иммунизации, Эрлих на основании собственных экспериментов понял, что антитела не возникают в организме после и в ответ на введение антигена, но *предсуществуют* в виде связанных с клетками рецепторов. Понятие и термин «рецепторы» в биологию ввел именно Эрлих в 1900 г. Под рецепторами, как и мы сейчас, он понимал молекулярные структуры живых клеток, *химически комплементарные* антигену. Концепцию в целом Эрлих назвал *теорией боковых цепей*. Этот термин он заимствовал у физиолога Эдуарда Фридриха Пфлюгера, который применил представления структурной органической химии к живым клеткам: радикалы, боковые цепи молекул живые клетки используют для захвата питательных веществ и кислорода из окружающей среды. Поразительно, но Эрлих понимал, что антитела в виде рецепторов на клетках являются **нормальным продуктом жизнедеятельности организма**, имеющими некие **физиологические функции**, не зависящие от наличия *инфекционных патогенов*. Иммунизация или инфицирование, как понимал Эрлих, вызывают лишь увеличение продукции соответствующих рецепторов и отрыв их от клеток и попадание в растворимой форме в жидкие ткани (кровь, секреты). Эрлих убедился, что сами по себе антитела не разрушают антиген, (как думал Э. Беринг), а лишь связывают его и доставляют к каким-то клеткам для разрушения, например фагоцитам Мечникова. Сам Эрлих не спорил с И.И. Мечниковым, своим «напарником» по Нобелевской премии 1908 г., а видел непротиворечивое единение гуморальных и клеточных концепций иммунитета. Свои «боковые цепи» Эрлих «видел» как клеточные структуры — рецепторы для антигенов на поверхности клеток.

В рукописях Эрлих рисовал антитела в виде роготок, как и мы сейчас, но мы-то делаем это после расшифровки структуры молекул иммуноглобулинов Родни Портером, Г.М. Эдельманом и М.Д. Поуликом, опубликованной в 1962 г., а Эрлих задолго до того. Более того, Эрлих понял, что у молекул антител есть две части — одна для связывания антигена (со-

временный Fab-фрагмент), вторая — для связи с клетками (современный Fc-фрагмент). Эрлих постулировал чрезвычайно большое разнообразие вариантов «боковых цепей» — рецепторов для антигенов. Как мы знаем, в наше время это разнообразие беспрецедентно. Но во времена Эрлиха и позже эта его идея стала поводом для несогласия со стороны таких именитых ученых, как Карл Ландштейнер, Ж. Борде, М. Грубер, С. Аррениус, Т. Мадсен, Ф. Гауровиц, Л. Полинг. Критики полагали, что с чего бы это в организме предсуществовать рецепторам (антителам) к самым разным веществам, с которыми организм, скорее всего, никогда может и не встретиться. Оппоненты Эрлиха формулировали так называемые *инструктивные теории иммунитета*, предполагавшие, что до попадания антигена в организм все молекулы иммуноглобулинов одинаковы и уже сам антиген формирует комплементарное себе антитело из ранее неспецифичной молекулы. К. Ландштейнер представлял, что «нормальные» антитела после введения антигена «адаптируются» к нему, становясь «иммунными». Ж. Борде полагал, что одно и то же антитело может «надеть себя» на самые разные антигены. Эта идея получила название «унитарной теории иммунитета». В 1930 г. биохимик Феликс Гауровиц ту же идею в отношении антител, сформулировал другими словами — «инструктивная теория прямой матрицы», допуская, что антиген является матрицей для антител еще при их биосинтезе. В 1940 г. биохимик Лайнус Полинг придумал про то же самое еще один термин — «варибельный фолдинг».

Последующие 100 с лишним лет развития иммунологии показали, что прав был П. Эрлих. Однако некоторая правда присутствует и в представлениях Лайнуса Полинга. Накопившиеся современные данные показывают, что специфичность антител по антигену никогда не абсолютна. Одно и то же антитело может связать со сравнимой аффинностью априорно неопределенное количество разных антигенов, но не в соответствии с теорией «прямой матрицы». При развитии иммунного ответа сначала процессы идут в соответствии с клонально-селекционной теорией П. Эрлиха, но уже синтезированные определенными клонами В-лимфоцитов антитела могут работать «по варибельному фолдингу» Л. Полинга, устанавливая с лигандами, как мы знаем теперь, ионные, водородные, ван-дер-Ваальсовы и гидрофобные связи. При этом иммунологическая специфичность, даже и в интервальной варибельности связей с лигандами — одна из основных теорем иммунологии [2].

Эрлих понимал, что антиген *выбирает* для массовой продукции антител клетки с комплементарными этому антигену боковыми цепями. В 1897 г. он сфор-

мулировал своё понимание развития иммунного ответа как **клонально-селекционную теорию иммунитета**. Через 58 лет, в 1955 г. селекционную теорию сформулировал Нильс Йерне (N. Jerne), который предположил, что введение антигена вызывает саморазмножение молекул антител, а исходное разнообразие антител формируется случайным образом (randomly) в начальный период онтогенеза иммунной системы. Третьим сторонником клонально-селекционной теории иммунитета стал Дэвид Талмадж (D.W. Talmage), опубликовавший свои взгляды в 1956 г. [8]. Его имя мало известно современным иммунологам. Он выполнил в 50-е годы нестандартные эксперименты по изучению специфичности антител (антисывороток) и пришел к неожиданным для других выводам о том, что одна антисыворотка может реагировать со сравнимой аффинностью более чем с одним антигеном, кроме того, которым иммунизировали животное [17]. Талмадж экспериментально опроверг (или, мягче говоря, не подтвердил) идею об абсолютной специфичности антител по антигену. В его время этот вывод не получил признания коллег, но в наше время большинство иммунологов признают не соответствующим действительности представление о том, что «каждому антигену — свое антитело». Это понимание позволяет адекватно интерпретировать ложноположительные и ложноотрицательные результаты диагностических иммуноанализов как неизбежные, «внутренне присущие» явления.

В 1957 г. Ф.-М. Бернет (F.M. Burnet) по его собственному признанию модифицировал теорию Йерне, «перенеся» процесс селекции с молекул антител на клетки (как у П. Эрлиха) и уже в четвертый раз в истории науки сформулировал клонально-селекционную теорию иммунитета [5].

Эрлих придумал метод титрования антисывороток и антигенов в качестве метода количественной оценки данных субстанций. Эрлиху государство организовало на казенные средства Прусский королевский институт тестирования сывороток в г.Штеглице под Берлином. В первую очередь продуктом сертификации, как бы сейчас это назвали, были лошадиные антисыворотки против дифтерийного токсина, получаемые на предприятии «Farbwerke Hoechst» и других лицензированных к тому времени лошадиных фермах. Качество антисывороток из рук П. Эрлиха было столь высоким, что они были в 1894 г. успешно применены для лечения 220 детей, больных дифтерией.

Эрлих получал антитела против других антител и предполагал, что анти-антитела выполняют регуляторные функции. Через полвека Нильс Йерне опубликовал *теорию иммунологической сети*, т.е. как раз теорию выработки в организме анти-антител, за что получил в 1984 г. нобелевскую премию.

С 1899 г. П. Эрлих с Ю. Моргенротом изучали аутоиммунные процессы. Это была настоящая революция в научном мышлении, потому что все остальные иммунологи представляли о как защиту от инфекций, или как минимум, ответные реакции на внешние субстанции. В настоящее время мы знаем более 150 нозологий аутоиммунных болезней. В организме нет ни одного органа, ни одной ткани, которые бы не подвергались разрушению собственной иммунной системой в тех или иных случаях.

В 1899—1901 гг. Пауль Эрлих с Юлиусом Моргенротом изучали гемолизины — антитела против эритроцитов, которые при добавлении еще и комплемента вызывают лизис эритроцитов, и разработали метод их количественной оценки. Кстати, термин «комплемент» также (как и антитела) ввел Эрлих вместо терминов аддимент Ж. Борде или алексин (alexins) Х. Бюхнера. В ходе этой работы Эрлих с Моргенротом открыли 4 эритроцитарные группы крови у коз и назвали их просто А, В, С, D. Так что Эрлих — первооткрыватель феноменов еще и в области иммуногенетики и иммуногематологии. Карл Ландштейнер, получается, повторил на человеческой крови работу Эрлиха и Моргенрота по эритроцитарным группам крови, которых для начала также выявил четыре — А, В, АВ, 0.

В 1901 г. Эрлих на частные деньги организовал в своем франкфуртском институте отдел по изучению рака, названный по имени спонсора «Георг-Шпейер-Хауз». Эрлих считал, что для того, чтобы работать в науке, нужны четыре G — GGGG: geld, gedult, geschick, gluck — деньги, терпение, умелые руки, удача [3]. Несколько лет Эрлих потратил на экспериментальные исследования противоопухолевого иммунитета на модели перевивной аденокарциномы мышей. Он первым сформулировал идею об *иммунологическом надзоре*. Однако Эрлих не получил экспериментальных данных «за» иммунный ответ против опухолей и оставил эту тематику как бесперспективную. Через полвека после Эрлиха те же слова об «иммунологическом надзоре», только на английском воспроизвел Ф.-М. Бернет.

Таким образом, если собрать вместе вышеприведенные идеи П. Эрлиха, то получится теория иммунитета, существенно соответствующая современным фактическим данным.

До того, как стать иммунологом, П. Эрлих подбирал дифференциальные анилиновые красители для белых клеток крови и ему все мы обязаны знанием и умением различать, и даже названиями клеток крови — нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, тучных клеток. Более того, в 1891 г. Эрлих сформулировал концепцию кроветворения, в которой разграничил два ростка — гранулоцитов и лимфоцитов. В экспери-

ментах с введением красителей животным *in vivo* Эрлих открыл существование гематоэнцефалического барьера.

Эрлих во всем своем научном мировоззрении руководствовался «сквозной» идеей рецепторных взаимодействий внутри живого организма. Фактически, он создатель и верный служитель физиологической химии. Это не синоним биохимии. Эрлих комплементарные структурно-химические взаимодействия «видел» не в колбах и пробирках, а в живых телах.

Разуверившись в иммунотерапии опухолей, он переклочил свою голову и работу своего института на химиотерапию, а именно, на поиск «магических пуль» — химических веществ, специфически находящихся в организме и поражающих определенные мишени. Для начала в качестве мишени Эрлих выбрал микроба — возбудителя сифилиса — *Treponemapallidum*. Он заставил своего главного химика Бертхейма синтезировать и модифицировать сотни ртутьсодержащих соединений. Соединение №606 (диоксидиаминоарсенобензол дигидрохлорид) оказалось почти тем, что нужно. В экспериментах на мышках и кроликах препарат 606 убивал бледную трепонему, но животное в целом как будто бы оставалось в целостности и сохранности. В 1910 г. препарат 606 Эрлих назвал сальварсаном и предложил для лечения людей. В те годы сальварсан помог сотням больных сифилисом и его считали медицинским чудом [3, 8, 14]. Проблема оказалась в том, что полезным и безвредным сальварсан был только в супераккуратных руках авторов. При контакте с кислородом воздуха он быстро превращался в токсичное и неприемлемое в качестве лекарства вещество, поэтому сальварсан не сохранил своего терапевтического значения до наших дней.

Существенный, но удивительным образом незамеченный другими, вклад в иммунологию внес Джеймс Мёрфи, сотрудник лаборатории Пейтона Рауса в Рокфеллеровском университете в США. Он нашел соответствие структуры и функции в иммунном ответе, а именно показал, что иммунные функции выполняют такие структуры, как лимфоциты. В работах 1912—1926 гг., которые он ежегодно публиковал, Мёрфи описал морфологические наблюдения об участии лимфоцитов в отторжении чужеродных трансплантатов, в реакциях трансплантат против хозяина, в реакциях на микобактериальные инфекции. Но, в отличие от работ П. Эрлиха, открытия Мёрфи ни иммунологи, ни гематологи не замечали почти полвека, пока их не «переоткрыли» другие люди [13, 16].

В 1960—1961 гг. Миллер и Митчел в опытах по неонатальной тимэктомии мышшей открыли иммунологические функции тимуса и, соответственно возникло знание по крайней мере о двух больших разновидностях лимфоцитов — В и Т [12]. Про В-лимфоциты

к этому времени уже знали, что они продуцируют антитела, а Т-лимфоциты, только появившись в знании людей, заняли позицию «центральных клеток» в иммунной системе.

Назовем еще одно фундаментальное открытие в иммунологии, принципиальное для понимания предмета — это «двойное распознавание», синоним — МНС-рестрикция иммунного ответа. МНС — major histocompatibility complex — главный комплекс гистосовместимости. Экспериментальных наблюдений, подводящих к нему, было сделано немало разными исследователями, но в 1975 г. Рольф Цинкернагель и Питер Дохерти опубликовали результаты экспериментов на модели, не имеющей никакого отношения к тканевой совместимости и трансплантациям, а именно на модели инфекции мышшей вирусом лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) [18]. В результате Цинкернагель и Дохерти открыли природную функцию (возможно, одну из) молекул главного комплекса гистосовместимости. Функция эта состоит в представлении антигена Т-лимфоцитам. Это объяснило накопившиеся факты, показывающие, что рецептор Т-лимфоцитов распознает (связывает) антиген не как таковой в чистом виде (в отличие от антител), а продукты катаболизма антигена, соединенные еще внутриклеточно в комплекс с молекулами МНС и экспрессированные в такой форме на мембранах неких клеток, названных первоначально вспомогательными, позже — антиген-представляющими. Таким образом, с 1975 г. фундаментальная иммунология располагает знанием о том, что иммунная система при дифференцировке лимфоцитов настраивается на распознавание «своего», а не «чужого». В последующие годы это положение получало только подтверждения экспериментальными и клиническими наблюдениями во всем мире, во всех лабораториях.

Но не менее очевидным является и то, что при попадании микроорганизмов во внутреннюю среду макроорганизма, последний в большинстве случаев активно реагирует на инфицирование. В 1994—1996 гг. Полли Матзингер (P. Matzinger) [11] и Чарльз Джанвэй (Ch. Janeway) [9] независимо один от другого пришли к непонятным поначалу для многих, но теперь уже общепринятым заключениям. П. Матзингер догадалась, что иммунная система распознает и реагирует не на «чужое» как таковое, а на «сигналы опасности» (danger signals) от поврежденных клеток *своего* организма.

Ч. Джанвэй постулировал, что «чужое» распознает не иммунная система (не лимфоциты), а некие первичные рецепторы для патогенов (PPR — primary pathogen receptors, ПРП) на «входных воротах» — т.е. на покровных тканях и на многих типах клеток во внутренней среде [9]. В конце 90-х — начале

2000-х годов эти ПРП были идентифицированы, и поиск новых продолжается. Оказалось, что таких рецепторов единицы, например: на клеточных мембранах 10 TLR, в цитозоле несколько NLR, несколько RIG-I-LR, PKR, OAS. Есть и гуморальные ПРП — это давно известные белки крови — CRP, MBL, LBP, PGBP, C1q, C3b. То, что в последнее время на некоторых субпопуляциях лимфоцитов выявили ПРП, не нарушает, а скорее гармонизирует общую концепцию иммунного ответа.

Разнообразие же рецепторов лимфоцитов для антигенов имеет существенно другие количественные характеристики: расчетные значения на протяжении онтогенеза для TCR 10^9-18 , для BCR 10^9-16 [9].

На границе XIX и XX веков, когда иммунология начала оформляться в самостоятельную нормативную науку в тесной связи с микробиологией, и иммунитет большинство людей воспринимало как защиту от инфекций, было сделано немало открытий, показывающих, что иммунные ответы развиваются не только против микробов, но и против самых разных веществ немикробного происхождения (о чем мы писали выше). Кроме того, на «параллельной прямой» накапливались факты о повреждающем действии иммунной системы на клетки, ткани и органы самого организма. Приведем примеры из истории [2, 3, 7, 8, 14]. В 1900 г. П. Эрлих и К. Ландштейнер обнаружили и исследовали антителозависимый гемолиз. В 1902 г. Ян Дениз обнаружил, что при увеличении концентрации антитоксических антител, повреждающее действие микробных токсинов *in vivo* усиливается, вместо того, чтобы ослабляться. В 1903 г. Николас Артюс описал некроз тканей в месте инъекции антигена иммунному, но не интактному животному (феномен Артюса). В 1905 г. Клемент фон Пирке и Бэла Шик описали сывороточную болезнь при серотерапии дифтерии и ввели термин *аллергия*. В 1906 г. — Ричард Отто описал системную анафилаксию со смертельным исходом при введении антигена предиммунизированным (сенсibilизированным) морским свинкам. В 1922 г. Ханс Цинссер ввел понятия немедленной и замедленной гиперчувствительности у предиммунизированных организмов. В 1933 г. Карл Праустниц ввёл себе внутрикожно сыворотку своего коллеги Кюстнера, страдающего пищевой аллергией, туда же вводил аллерген и наблюдал локальный некроз (реакция Праустниц-Кюстнера). В 1937 г. Григорий Шварцман наблюдал системные и локальные тромбозы при введении бактериальных эндотоксинов (ЛПС) (феномен Шварцмана). Как мы знаем теперь, это не иммунная реакция, но гиперергическая реакция «врожденного иммунитета». В 1969 г. П. Джелл и Э.А. Ваксман и в 1975 г. тот же П. Джелл и Р.Р.А. Кумбс обобщили и систематизи-

ровали представления о четырёх типах механизмов иммунного повреждения тканей:

- I тип — гиперчувствительность немедленного типа или анафилаксия;
- II — цитотоксические антитела;
- III тип — болезни иммунных комплексов;
- IV тип — гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) или антитело-независимое повреждение тканей с участием иммунных лимфоцитов [8].

В наше время медицинской науке известно больше 150 нозологий аутоиммунных болезней. Аутоиммунные заболевания являются весьма сложными для лечения, почти всегда инкурабельными в смысле полного излечения. Их возможно корректировать симптоматической и лишь отчасти патогенетической (иммунодепрессантами) терапией, клонально-селективной терапии до сих пор нет.

Мы привели немного имен. На самом деле в общечеловеческую сумму знаний по иммунологии вложили свой труд очень и очень многие. Одних только нобелевских премий за работы, вносящие вклад в развитие иммунологии, не менее 60 [2, 19]. Значения каждой из этих работ равновелики. Тем не менее, напомним немногие, обеспечившие скачкообразные переходы в понимании природы иммунитета как совокупной функции иммунной системы. Среди таких самая первая (не только по медицине, но исторически первая из всех) премия в 1901 г. — Эмиля фон Беринга за серотерапию дифтерии; 1908 г. — Пауль Эрлих и И.И. Мечников — за гуморальную и клеточную составляющие иммунного ответа; 1976 г. — Рольф Цинкернагель и Питер Дохерти — за открытие природных функций белков главного комплекса гистосовместимости — представление антигенов генетически «родным» Т-лимфоцитам; 1987 г. — Сузуму Тонегава — за открытие явления ковалентной перестройки ДНК в лимфоцитах в генах иммуноглобулинов. Ни в каких других клетках эукариот такого явления никто до сих пор не видел, что «дает право» лимфоцитам быть специализированными клетками особой системы — иммунной.

Скачок в развитии теории иммунитета обеспечили и работы, не рассматриваемые нобелевским комитетом — это работы Полли Матзингер [11] и Чарльза Джанвэя [9], которые углубили осознание того, что не иммунная система первой распознает проникновение патогенов в организм, а иммунный ответ инициируется не на «чужое» как таковое, а на материальные «симптомы» повреждения клеток своего организма — «сигналы опасности». Это позволило «увидеть» функционирование иммунной системы *in vivo* в связи с доиммунными механизмами реагирования на повреждения, а также с другими системами целостного организма, в первую очередь с нервной и кроветворной [2].

Вклад отечественных врачей в иммунологию, исторически ассоциированную с микробиологией можно проследить с XVIII века [1, 2, 15]. М.М. Тереховский (1740—1796 гг.) занимался экспериментальной микробиологией — исследовал влияние температур, электричества, химических веществ на размножение и дыхание микроорганизмов и на 100 лет раньше Л. Пастера описал явление аттенуации микробов. Д.С. Самойлович-Сущинский (1744—1805 гг.) вошел в историю как первый охотник за возбудителем чумы и был избран членом 12 зарубежных академий наук его времени. Л.С. Ценковский (1822—1887 гг.) описал 43 новых вида микроорганизмов. Кроме того, он независимо от Пастера получил сибирязвенную вакцину и организовал в Харькове пастеровскую станцию.

И.И. Мечников (1845—1916 гг.) был одним из немногих первых иммунологов, который не был врачом, но занимался зоологией морских черноморских беспозвоночных. И это позволило ему сделать открытие, которое современники охарактеризовали как мысль «гиппократовского масштаба», а именно, он открыл *защитные функции* фагоцитоза. Явление поглощения белыми клетками крови бактерий наблюдали в то время многие врачи в препаратах из гнояников больных людей и трактовали эти наблюдения соответствующим образом, считая белые клетки разносчиками инфекции по организму. Мечников же видел, что целомощиты морских звезд (гомологи лейкоцитов млекопитающих) поглощают мелкие корпускулярные частицы или инкапсулируют крупные, что идет на пользу организму. И.И. Мечников вошел в историю науки как основоположник клеточной теории иммунитета [2, 3, 8, 16]. Вместе с П. Эрлихом в 1908 г. они получили нобелевскую премию за гуморальную и клеточную теории иммунитета. Но противопоставление «гуморалистов и клеточников» интерпретаторами их работ в более поздней литературе не вполне верно. «Боковые цепи» Эрлих «видел» как рецепторы для антигенов *на клетках*. Они отрываются от клеток и становятся гуморальными антителами только в процессе массовой выработки в ходе иммунного ответа. Более того, как мы уже упоминали, Эрлих осознавал, что антитела сами не разрушают антигены, но, связывая их, «приводят» на поглощение и разрушение к фагоцитам Мечникова

Д.И. Ивановский (1864—1920 гг.) открыл новую форму жизни — вирусы. Л.А. Зильбер (1894—1966 гг.) открыл вирус клещевого энцефалита и первым в мире начал изучение онкогенных вирусов. Он стал автором *вирусной теории рака*, в концепции которой постулировал интеграцию вирусных геномов в клеточные, что стало предвосхищением открытия ретровирусов. Несмотря на «железный занавес» Л.А. Зильбер был экспертом ВОЗ. Каждый, кто вы-

брал иммунологию и даже шире — медицину своей специальностью, знает имена таких ученых, как А.М. Безредка, И.И. Остромысленский, Л.А. Тарасевич, И.Г. Савченко, Н.Ф. Гамалея, Г.Н. Габричевский, Е.И. Марциновский, Н.Я. Чистович, П.Ф. Здродовский, Э.В. Ермольева, М.П. Чумаков, А.А. Смородицев, В.М. Жданов, Б.В. Первушин, А.А. Богомолец, А.Д. Адо, Р.В. Петров, Р.М. Хаитов, Л.С. Сеславина, и это далеко не все. Нобелевская премия по медицине в 2012 г. присуждена Д.Б. Гёрдону и Ш. Яманакэ за исследования в области репрограммирования дифференцированных клеток в плюрипотентное состояние. Гёрдон в 1962 г. вырастил лягушат *Xenopus laevis* из оплодотворенных икринок, которые он энуклеировал и подсадил туда ядро из эпителиальной клетки кишечника взрослой лягушки. Клонированные лягушата Гёрдона были слабыми и прожили недолго, но они были. В 1955 г. аналогичный опыт с другой амфибией *Rana pipiens* пробовали провести Кинг и Бриггс, но не получили ожидаемого результата. А идею такого эксперимента опубликовал еще раньше в 1935 г. Ганс Спеманн [19]. Ш. Яманакэ, хирург-ортопед, увлекшийся биотехнологией, в 2006 г. опубликовал разработанный им рецепт «коктейля Яманакэ» — 4 вектора экспрессии, содержащие ДНК определенных факторов транскрипции (Myc, Oct3/4, Sox2, Klf4), которые он подобрал из 24 перепробованных факторов транскрипции, характерных для эмбриональных стволовых клеток ES. Яманакэ трансфецировал эти вектора в фибробласты, чем превратил их в репрограммированные делящиеся клетки, которые назвал iPS — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. В последние годы рядом авторов описано несколько «коктейлей» из векторов экспрессии, трансфекция которых приводит с некоторой вероятностью к репрограммированию или трансдифференцировке соматических клеток [4, 19].

В связи с этим нельзя забывать еще два имени отечественных ученых. Это А.А. Максимов (1874—1928 гг.), который в 1902 г. сформулировал унитарную теорию кроветворения и постулировал существование единой для всех ростков кроветворения мезенхимальной камбиальной клетки, которую позже стали называть стволовой кроветворной клеткой. Второе имя — А.Я. Фриденштейн. В 1971 г. из его лаборатории вышла работа, в которой авторы получили пролиферацию в культуре *in vitro* клеток стромы костного мозга [9]. Он назвал эти клетки стромальными имеханоцитами. В наше время есть направление в экспериментальной медицине, названное регенеративной. Ряд исследователей стали называть клетки, открытые Фриденштейном, мезенхимальными стволовыми — MSC. Работ по регенеративной медицине в последние годы немало, появилось научное сообщество ISCT —

International Society for Cellular Therapy. Накопленный опыт показывает, что потенциал дифференцировки «клеток Фриденштейна» кроме стромы костного мозга все-таки не «стволовой», а ограничен (если не прибегать к «коктейлю Яманаки») дифференцировкой в адипоциты, хондроциты и остеобласты. Поэтому многие авторы предпочитают аббревиатуру MSC раскрывать как «мультипотентные мезенхимальные стромальные (а не стволовые) клетки» [4, 8].

Мы «отвлечлись» на стволовые клетки в связи с теориями иммунитета не только потому, что лимфоциты тоже дифференцируются из стволовых кроветворных клеток, но еще и потому что у лимфоцитов есть имманентные прорегенеративные функции за рамками их собственного гистогенеза, то есть лимфоциты, отработав цитотоксичность в отношении клеток-мишеней, начинают вырабатывать факторы роста, поддерживающие регенерацию тканей.

Преимственность знаний легко порвать и тогда наступает «маулигнизация» подрастающих поколений. В течение 40 лет, с конца 60-х годов XX века, студенты отечественных мединституты и дипломированные врачи, не утратившие интерес к профессиональному образованию, знакомились с иммунологией по учебнику «Иммунология» Р.В. Петрова, переизданного более 10 раз. Этот учебник по-настоящему «зажигал» интерес к этой науке и раздвигал её рамки за пределы микробиологии, распространяя на все медицинские специальности. И хотя по законам однонаправленного времени появилась и другая учебная литература по предмету, исторический вклад учебника Р.В. Петрова ни в коем случае нельзя забывать, на нем выросло не одно поколение врачей и иммунологов-исследователей, включая и тех, кто пишет новые учебники.

Возвращаясь к теориям иммунитета, нам осталось только «пересечь параллельные прямые» защитного и повреждающего действия иммунной системы. Этим пересечением будет осознание того, что у иммунной системы есть *физиологические функции в здоровом организме* в отсутствии инфекций и травм иного генеза. Это будет единственная наша «новелла» по сравнению с литературными данными. К этому представлению привел собственный многолетний опыт работы с перевивными культурами клеток млекопитающих *in vitro*. Наблюдения показывали, что *in vitro*, где нет иммунной системы, погибающие клетки неделями, месяцами и годами сохранялись в стерильной культуральной среде, не подвергаясь самораспаду или аутофагии. Эти наблюдения навели на мысль, что *in vivo* иммунная система в физиологическом режиме функционирования обеспечивает санирующую цитотоксичность и клиренс внутренней среды от устаревающих и погибающих клеток и продуктов их распада, чем обеспечивает возможность физиологической регенерации тканей организма.

То есть при физиологическом функционировании иммунная система работает в аутоиммунном режиме, но направленном не на жизнеспособные здоровые клетки, а на устаревающие и поврежденные. При инфекционном повреждении тканей или травмах иного генеза количество поврежденных клеток существенно больше физиологического и иммунная система начинает работать в режиме иммунного ответа на повреждение, и при этом реализует «продолжение физиологической цитотоксичности» и клиренса внутренней среды от продуктов распада. Последнее обеспечивают антитела, приводящие иммунные комплексы к фагоцитам. Будет иммунный ответ на патогенное повреждение преимущественно защитным или с заметной и болезненной деструкцией тканей, зависит от многого: от размеров травмы, силы факторов патогенности в случае микроорганизмов, индивидуальных свойств МНС и других биопараметров самого организма относительно свойств конкретного патогена, динамики размножения патогена и динамики пролиферации лимфоцитов, локализации патогена (иммунная система не забирается внутрь клеток, антитела и рецепторы лимфоцитов работают по поверхности клеток и в межклеточных пространствах, т.е. по фенотипу) и многого другого, о чем современная наука вероятно еще и не знает.

Как морфологически, т.е. анатомически и гистологически особенная система органов и тканей, иммунная система есть только у 1,5% видов животных, начиная с челюстных рыб, и это лимфоидная система [9]. Специализированные клетки иммунной системы — это только лимфоциты. Лимфоциты — единственный вид дифференцированных клеток, которые клонированы по рецепторам для антигенов и разнообразие рецепторов беспрецедентно велико. Известен не один десяток функционально различных субпопуляций лимфоцитов, в последнее время и таких, у которых нет рецепторов для антигенов — это так называемые *innate lymphoid cells* — ILC-1, 2, 3 типов. Кроме того, в процессе реализации жизненного цикла лимфоцитов, вероятно, имеет место пластичность дифференцировки, например, смена продуцируемых цитокинов с провоспалительных на супрессорные или прорегенеративные.

Коротко функции иммунной системы можно описать двумя словами — как в условиях физиологической нормы, так и при иммунных ответах на повреждения она *цитотоксична* и *прорегенеративна*. В физиологическом режиме цитотоксичность убирает устаревающие клетки, освобождая место для физиологической регенерации. При иммунном ответе на повреждение патогеном цитотоксичность направлена на поврежденные клетки, часто или всегда захватывая и нормальные ткани, и наступающая затем регенерация уже не вполне физиологическая.

Наиболее сложные для понимания явления, изучаемые иммунологией, это иммунологическая толерантность и иммунологическая память стоят отдельного обсуждения. Заметим только, что толерантность в норме «обслуживает» не только здоровые собственные ткани, что очевидно, но и бесконечное множество веществ из окружающей среды, которые неизбежно проникают через барьерные ткани из воздуха, пищи и чрезкожно, а также ятрогенно, как, например, всевозможные импланты. Очевидно, Полли Матзингер права, что для развития иммунного ответа не достаточно проникновения «чужого» во внутреннюю среду организма, но необходимы «сигналы опасности» от собственных поврежденных клеток и в достаточном количестве.

В завершение обозначим факторы, приводящие к «переключению» нормального физиологического функционирования иммунной системы к режиму иммунного ответа, приводящему к иммунному воспалению с проявлениями *rubor, tumor, calor, dolor et functio laesio*:

1) ход «биологических часов» — старение с неизбежным накоплением соматических мутаций, ошибок, биологических потерь субпопуляций клеток, что приводит к нормальным возрастным проявлениям аутоиммунных процессов (артриты, васкулиты, постепенное «выключения» желез внутренней секреции и т.д.);

2) патогенные воздействия из внешней среды, включая инфекционные, с травматизацией тканей, что приводит к развитию процессов иммунного воспаления с различными исходами: излечение с возвращением иммунной системы к физиологическому равновесию, или хронизация процесса с чередованием обострений и ремиссий;

3) выделим и подчеркнем опасность геномотропных воздействий из внешней среды — особенной пищи, лекарств, техногенных физических факторов, реагентов для биотехнологий — по двум причинам: во-первых, таких воздействий становится все больше и больше, во-вторых, иммунная система не отслеживает генетические мутации и не корректирует их. Биологических механизмов клиренса внутренней среды, более специфичных, чем иммунная система, на современном уровне знаний неизвестно. Отсюда следует, что, насколько это зависит от воли человека, геномотропные воздействия можно не допускать, но нельзя исправить.

Как показывают многочисленные клинические наблюдения и международный опыт фармакотерапии, избыточная стимуляция иммунной системы может иметь такие осложнения, как лимфопролиферативные

процессы и нефизиологические аутоиммунные повреждения тканей и органов, из чего следует, что чем меньше давление оказывать на иммунную систему извне, тем больше вероятность сохранения имеющегося уровня здоровья.

Список литературы

1. *Большая медицинская энциклопедия*. М., 3-е изд-е, Т. 9, 13, 20.
2. Хайтов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. *Иммунология. Нормы и патология*. М.: Медицина, 2010. 750 с.
3. Ульянкина Т.И. *Зарождение иммунологии*. М.: Наука, 1994. 319 с.
4. Atala A., Lanza R., Thomson J.A., Nerem R. *Principles of regenerative. Medicine*. Academic Press, Elsevier, 2011, 1182 p.
5. Le Blane K., Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nature Rev. Immunology*. 2012; 12 (5): 364—78.
6. Burnet F.M. *The Clonal Selection Theory of Antibody Formation*. Cambridge Univ. Press, 1959.
7. Ehrlich P. *Klin. Jahrb.*, 1897, Vol. 60, P. 299—334 (English translation in The Collected Papers of Paul Ehrlich, Vol. 2, New York, Pergamon Press, 1957, P. 107—125).
8. Cruse J.M., Lewis R.E. *Historical Atlas of Immunology*. Taylor & Francis Group, London and New York, 338 p.
9. Janeway Ch.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.J. *Immunobiology*. 6th ed., Garland Science, N.Y. and London, 2005, 823 p.
10. Luria E.A., Panasyuk A.F., Fridenstein A.Y. Fibroblast colony formation monolayer cultures of blood cells. *Transfusion*. 1971; 11: 345—9.
11. Matzinger P. An innate sense of danger. *Seminars Immunol*. 1998; 10, 399—404.
12. Miller J.F.A.P. Immunological function of the thymus. *Lancet*. 1961; 2: 748—9.
13. Murphy J.B. The Lymphocyte in relation to Tissue Grafting, malignant disease and tuberculous infection, an Experimental study. *Monographs of the Rockefeller Institute for Medical Research*, No. 21, N.Y., 1926.
14. Nagy Z.A. *A History of Modern Immunology. The Path toward Understanding*. Elsevier, 2014. 340 p.
15. Ostromuislensky I.I. *Journal of the Russian Physicochemical Society*. 1915; 47: 263.
16. Silverstein A.M. *A History of Immunology*. Elsevier, 2009, 530 p.
17. Talmage D.W. Immunological specificity. *Science*. 1959; 129: 1643—57.
18. Zinkernagel R.M., Doherty P.C. H-2 compatibility requirement for T-cell mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Exp. Med.* 1975; 141, 1427.
19. www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine

Поступила 03.04.14
Received 03.04.14

Султанов Д.В., Хугаева В.К.

Метод прижизненного изучения микроциркуляции легких у крыс с помощью модифицированной камеры

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

Предлагается модифицированный метод, который позволяет проводить прижизненное изучение микроциркуляции легких крысы при помощи специальной камеры. Особенностью метода является стабильная фиксация ткани легкого, что исключает ее смещение во время исследования. Получено изображение поверхностных тканей легких в естественных условиях (альвеолы с окружающими их со всех сторон капиллярами).

Ключевые слова: метод, микроциркуляция, легкие, альвеолы

Sultanov D.V., Khugaeva V.K.

Metod in vivo study of the microcirculation in rat lung using a modified technique

Institute of General Pathology and Pathophysiology of the Russian Academy of Medical Sciences,
125315, Baltiskaya Street, 8, Moscow, Russia

A modified technique that allows in vivo study microcirculation in the rat lungs using a special camera. Feature of the method is stable fixation of lung tissue, which prevents its displacement during the study. Imaged surface of the lung tissue (alveoli with surrounding them on all sides capillaries).

Key words: method, microcirculation, lung, alveolus

Изучение микроциркуляции в постоянно двигающихся органах, таких, как сердце и легкие, представляет большую проблему, связанную с решением нескольких задач: создание неподвижных участков для биомикроскопии, фото- и видеорегистрации микрососудов не нарушая физиологической активности органа.

Отсутствие широкого распространения прямых методов и заводского оборудования для изучения микроциркуляции в легких приводит к использованию косвенных методов оценки легочной циркуляции при интерпретации изменений микроциркуляции в других органах, более доступных для исследования. Примером могут служить работы, в которых изучают микроциркуляцию бульбоконъюнктивы глаза человека [2], брыжейки тонкой кишки крысы [8], используют лазерную доплеровскую флоуметрию с целью найти возможную аналогию с изменениями в микрососудах легких в условиях патологии.

Более 300 лет прошло с начала изучения микроциркуляторного русла легких. Первые работы Mal-

pighi (1686—1687 гг.) были выполнены на легком лягушки. Значительно позже моделью исследования легких были и другие животные: ежи, крысы, кролики, морские свинки, кошки, собаки [1, 3—7, 9—10]. Однако до настоящего времени нет полного представления о строении системы микроциркуляции легких и ее функционировании. Это приводит к неадекватному использованию лекарственных препаратов при патологии легких.

Примером может служить применение при пневмонии и отеке легких некоторых препаратов с целью дегидратации легких. По данным [8], среди них встречается большое число веществ наоборот тормозящих моторику лимфатических микрососудов, что способствует гипергидратации тканей.

Цель нашей работы — создание доступной и несколько упрощенной модификации метода изучения микроциркуляции легких с помощью камеры для мелких экспериментальных животных.

В работе апробирован новый вариант метода прижизненного изучения микроциркуляции легких. Важной особенностью метода является стабильная фиксация ткани легкого, что исключает ее смещение во время исследования.

Для корреспонденции: Султанов Делюс Вилевич (Sultanov Delyus Vilevich), н.с. лаборатории хронического воспаления и микроциркуляции НИИ ОПП РАМН, e-mail: delsv2014@mail.ru

Главным составным элементом является специальная камера (рис. 1), позволяющая использовать контактный объектив (ЛОМО) с увеличением $\times 10$.

Камера состоит из цилиндра с двойными стенками. Внутренний диаметр камеры равен 6 мм, наружный — 10 мм. Полость между стенками изолирована. Исключением являются три участка с отверстиями в нижней части цилиндра, сделанные специально для фиксации легкого в результате создания отрицательного давления между стенками фиксатора. Отверстия расположены с трех сторон. Четвертое отверстие не производилось с целью предотвращения нарушений микроциркуляции на поверхности исследуемой части легкого.

Снаружи камера жестко закрепляется с помощью специального фиксатора к столику для исследования животного.

Методика используется у наркотизированных хлоралгидратом животных (1,6 мг/кг массы животного в/м) массой 200—350 г. Далее производится трахеостомия с временным подключением к аппарату искусственного дыхания ЭМИБ. Животное располагают на специальном операционном столике. На уровне 5—6 межреберного промежутка производится торакотомия с удалением одного из ребер на протяжении 1 см. В образовавшееся окно устанавливается камера. В камере создается отрицательное давление в результате откачивания воздуха через специальную металлическую трубку (рис. 1). При этом легкое фиксируется к устройству, что создает удовлетворительные условия для исследования поверхности легкого (рис. 2).

Для дополнительной герметизации плевральной полости по наружному контуру камеры фиксируется кусок клеенчатой ткани, которая плотно прилегает к тканям в непосредственной близости от отверстия в грудной клетке. После установки камеры (общее затраченное время от момента начала торакотомии до фиксации легкого не превышало 2 мин) крысы отключается от аппарата искусственного дыхания. В образовавшееся окно вводится контактный объектив. Поверхность исследуемого участка легкого предварительно орошается физиологическим раствором.

На рис. 2 представлена биомикроскопическая картина легких в норме, в которой каждая альвеола окружена капиллярным ободком.

Предложенная методика отличается от других методов исследования микрососудов легких отсутствием стеклянного перекрытия цилиндра и громоздкого крепежа. Она дает качественное прижизненное изображение поверхностных тканей легких крысы, что позволяет напрямую изучать микроциркуляцию легких.

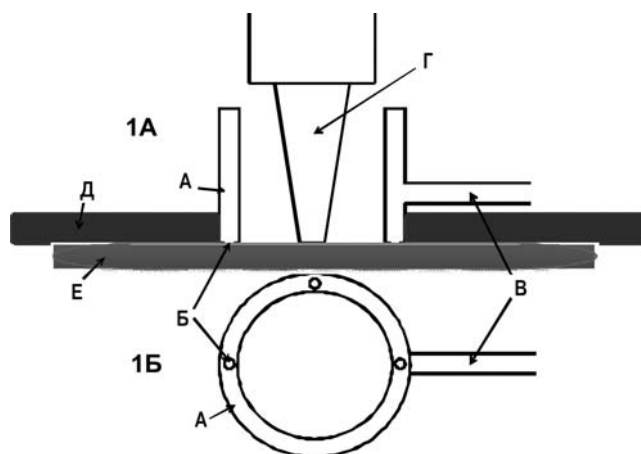


Рис. 1. Схема камеры для изучения микроциркуляции легких у крысы в остром эксперименте:

- 1А — вид сбоку;
- 1Б — вид с легочной поверхности;
- А — камера;
- Б — отверстие для фиксации ткани легкого;
- В — металлическая трубка для откачивания воздуха из внутренней части камеры;
- Г — контактный объектив с увеличением $\times 10$;
- Д — грудная клетка;
- Е — ткань легкого.

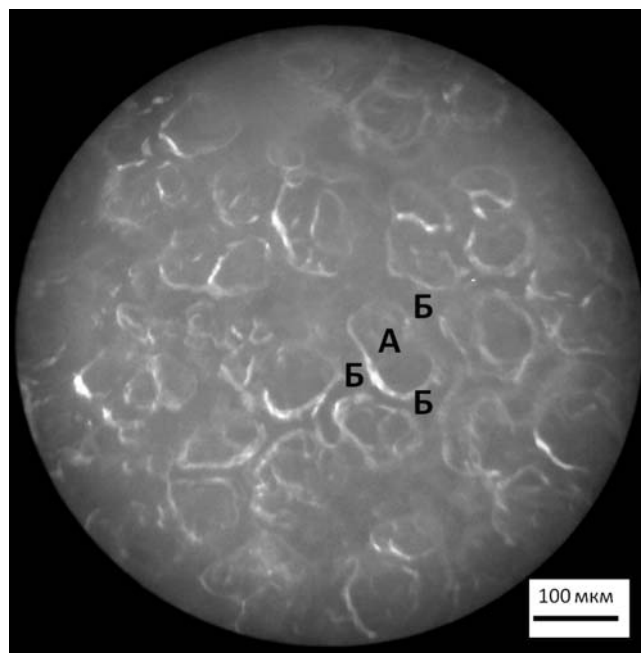


Рис. 2. Биомикроскопия легких: А — альвеола; Б — капилляр. Увеличение: об. $\times 10$; ок. $\times 10$.

Список литературы

References

1. Алейников С.О. *Микроциркуляция и гемодинамика легких в норме и при экспериментальной пневмонии*: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. М.; 1991, 23 с.
2. Егоршин В.Ф. *Состояние микроциркуляции у больных хроническими неспецифическими заболеваниями легких*: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н., Л., 1982, 19 с.
3. Иванов К.П., Мельникова Н.Н., Потехина И.Л. Конструкция сети микрососудов легких и особенности кровообращения в них. *Бюлл. exper. биол.* 2011; 4: 368–70.
4. Иванов К.П., Потехина И.А., Алюхин Ю.С., Мельникова Н.Н. Микроциркуляция в легких: некоторые особенности конструкции и динамика. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция.* 2010; 3: 81–3.
5. Красников В.Е. *Структурно-функциональные аспекты изучения микроциркуляции легких в условиях нормы и патологии (экспериментальное исследование)*: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. М.; 1981, 27 с.
6. Маруев Д.С. *Микроциркуляция в легких при лучевой болезни*. Микроциркуляция. М., 1972: С.193–4.
7. Саноцкая Н.В., Мацеевский Д.Д., Алейников С.О. Легочное и бронхиальное кровообращение, микроциркуляция легких при острой гипоксической гипоксии. *Успехи физиол. наук.* 1994; 25 (4): 53–8.
8. Султанов Д.В., Хугаева В.К. Лимфостимулирующая активность препаратов, применяемых при отеке легких. *Патогенез.* 2011; 3: 65.
9. Bhattacharya S., Glucksberg M.R., Bhattacharya I. Measurement of lung microvascular pressure in the intact anesthetized rabbit by the micropuncture technique. *Circulat. Res.* 1989; 64 (1): 167–72.
10. Wearn J.T., Ernstone A.C., Bromer A.W. et al. The normal behavior of the pulmonary blood vessels with observations on the intermittence of the flow of blood in the arterioles and capillaries. *Amer. J. Physiol.* 1934; 109: 236–56.

1. Aleynikov S.O. *Microcirculation and lung hemodynamics in normal and experimental pneumonia*: Avtoref. Diss. na soiskanie uchenoy stepeni k.m.n. — Moscow, 1991, 23 s. (in Russian)
2. Egorshin V.F. *Microcirculation in patients with chronic nonspecific lung diseases*: Avtoref. Diss. na soiskanie uchenoy stepeni k.m.n., L., 1982, 19 s. (in Russian)
3. Ivanov K.P., Mel'nikova N.N., Potekhina I.L. Network design and features of pulmonary microvascular blood flow in them. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2011; 4: 368–70. (in Russian)
4. Ivanov K.P., Potekhina I.A., Alyukhin Yu.S., Mel'nikova N.N. Microcirculation in the lungs: some design features and dynamics. *Regional circulation and microcirculation.* 2010; 3: 81–3. (in Russian)
5. Krasnikov V.E. *Structural and functional aspects of the study of the lung microcirculation in normal and pathological conditions (experimental study)*: Avtoref. Diss. na soiskanie uchenoy stepeni k.m.n. Moscow, 1981, 27 s. (in Russian)
6. Maruev D.S. Microcirculation in the lungs during radiation sickness. *Microcirculation.* M., 1972: S.193–4. (in Russian)
7. Sanotskaya N.V., Matsievskiy D.D., Aleynikov S.O. Pulmonary and bronchial circulation, pulmonary microcirculation during acute hypoxic hypoxia. *Advances Physiol. Sciences.* 1994; 25 (4): 53–8. (in Russian)
8. Sultanov D.V., Khugaeva V.K. Limfostimuliruyaschaya activity of the preparations used in pulmonary edema. *Pathogenesis.* 2011. №3. S.65. (in Russian)
9. Bhattacharya S., Glucksberg M.R., Bhattacharya I. Measurement of lung microvascular pressure in the intact anesthetized rabbit by the micropuncture technique. *Circulat. Res.* 1989; 64 (1): 167–72.
10. Wearn J.T., Ernstone A.C., Bromer A.W. et al. The normal behavior of the pulmonary blood vessels with observations on the intermittence of the flow of blood in the arterioles and capillaries. *Amer. J. Physiol.* 1934; 109: 236–56.

Поступила 10.07.14
Received 10.07.14

Сведения об авторах:

Хугаева Валентина Каргоевна (Khugaeva Valentina Kargoevna) — гл. науч. сотр. лаборатории хронического воспаления и микроциркуляции НИИ ОПП РАМН