

**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 «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 диссерта-  
ций на соискание ученой степени докто-  
ра и кандидата наук.

**ИФРИНЦ 0,413**

Журнал включен в базу данных Scopus

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*

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. №4. 1—146.

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 НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НИИ ОБЩЕЙ ПАТОЛОГИИ И ПАТОФИЗИОЛОГИИ»

# ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

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

Том 58, №4, 2014

ОКТАБРЬ—ДЕКАБРЬ

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

**Главный редактор Б.Б. Мороз**

Ю.В. Архипенко, Е.И. Асташкин, С.В. Грачев,  
Н.С. Гурко (ответственный секретарь), Т.А. Гуськова,  
И.С. Гушин (зам. главного редактора), А.В. Ефремов,  
В.Б. Кошелев, Н.А. Крупина, А.А. Кубатиев,  
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

ЛР №010215 от 29.04.97.

Издатель: ООО «Гениус Медиа»  
E-mail: genius-media@mail.ru  
ИФРИНЦ 0,413

ISSN 0031-2991  
Pathological  
physiology  
and experimental  
therapy  
2014. Vol. 58. №4. 1–146.

Moscow

© ООО «Genius Media», 2014.

FEDERAL STATE INSTITUTION «SCIENTIFIC RESEARCH  
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, №4, 2014

October—December

**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



9 770031 299001

## СОДЕРЖАНИЕ

- Гусев Е.Ю., Черешнев В.А.* Системное воспаление: теоретические и методологические подходы к описанию модели общепатологического процесса. Часть 4. Динамика процесса . . . . . 4

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Кожевникова Л.М., Меситов М.В., Павлова О.В., Московцев А.А.* Агонисты 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов SCH 23390 и МК 212 увеличивают силу сокращения аорты крысы в присутствии вазопрессина или ангиотензина II . . . . . 17
- Крупина Н.А., Орлова И.Н., Лукьянова Л.Д.* Влияние курсового применения биологически активного флавоноидсодержащего растительного препарата Экстралайф на уровень тревожности и сенсомоторную реактивность крыс . . . . . 30
- Кирова Ю.И.* Роль системы глутатиона в регуляции окислительно-восстановительного статуса коры головного мозга крыс при гипоксии . . . . . 40
- Трегуб П.П., Куликов В.П., Степанова Л.А., Забродина А.С., Нагибаева М.Е.* Роль аденозиновых А<sub>1</sub>-рецепторов и митохондриальных K<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов в механизме увеличения резистентности к острой гипоксии при сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии . . . . . 48
- Силачев Д.Н., Манских В.Н., Гуляев М.В., Певзнер И.Б., Зорова Л.Д., Бабенко В.А., Плотников Е.Ю., Пирогов Ю.А., Зоров Д.Б.* Ишемия головного мозга вызывает патологические изменения, сходные с наблюдаемыми при болезни Альцгеймера . . . . . 53
- Меркулов Ю.А., Пятков А.А., Меркулова Д.М.* Особенности ремоделирования регуляции вегетативных функций человека при адаптации организма к экстремальным условиям в трудовой деятельности . . . . . 59
- Дзугков С.Г., Можаяева И.В., Гиголаева Л.В., Тедтоева А.И., Маргиева О.И., Дзугкова Ф.С.* Изменение биохимических показателей крови на фоне регуляторов экспрессии эндотелиальной NO-синтазы при кобальтовой интоксикации . . . . . 66
- Кузнецова Е.И.* Нейротоксическое влияние химиотерапии на функции ЦНС у детей с лимфоидными опухолями . . . . . 71
- Гильяно Н.Я., Бондарев Г.Н., Конева Л.В., Носкин Л.А., Журишкина Е.В., Алчинова И.Б.* Возможные механизмы селективного действия ингибиторов гликолиза на эндотелиоциты и клетки карциномы человека в культуре . . . . . 78
- Абакумова Т.В., Антонева И.И., Генинг Т.П., Генинг С.О., Долгова Д.Р., Фомина А.В.* Цитокиновый профиль и метаболическая активность нейтрофилов периферической крови при прогрессировании неоплазмы . . . . . 86
- Ремизова М.И., Гербут К.А., Гришина Г.В., Нагорная К.Н.* Действие доноров оксида азота на микроциркуляцию при инфузионной терапии геморрагического шока в эксперименте . . . . . 91

## ОБЗОРЫ

- Решетняк В.К., Кукушкин М.Л., Гурко Н.С.* Значение корково-подкорковых структур мозга в восприятии острой и хронической боли . . . . . 96
- Иванов В.В., Шахристов Е.В., Степовая Е.А., Носарева О.Л., Федорова Т.С., Новицкий В.В.* Молекулярные механизмы модуляции липолиза в жировой ткани и развитие инсулинорезистентности при сахарном диабете . . . . . 111

## МЕТОДИКА

- Сабурин И.Н., Колокольцова Т.Д., Копяев С.Ю., Зурина И.М., Борзенко С.А.* Опыт культивирования клеток переднего эпителия роговицы глазного яблока человека . . . . . 120
- Чаусова С.В., Гуревич К.Г., Бондарева Г.П., Филатов О.Ю., Малышев И.Ю.* Возможность диагностики непереносимости нестероидных противовоспалительных препаратов по изменению хемилуминесцентного свечения полиморфно-ядерных лейкоцитов периферической крови . . . . . 127
- Шойбонов Б.Б., Кравченко М.А., Баронец В.Ю., Толпыго С.М., Костырева М.В., Шабалина А.А., Замлодчикова Т.С., Котов А.В., Панченко Л.Ф.* Определение атерогенности иммунных комплексов, содержащих модифицированные липопротеины, в тесте связывания компонента . . . . . 133

## ПАМЯТНЫЕ ДАТЫ

- Пальцын А.А.* Врач-философ — Донат Семенович Саркисов (к 90-летию со дня рождения) . . . . . 139

## CONTENTS

- Gusev E.Yu., Chereshnev V.A.* Systemic inflammation: theoretical and methodological approaches to description of general pathological process model. Part IV. A dynamics of the process

## ORIGINAL ARTICLES

- Kozhevnikova L.M., Mesitov M.V., Moskovtsev A.A.* Agonists of 5HT<sub>2C</sub>-receptors SCH 23390 and MK 212 increase the force of rat aorta contraction in the presence of vasopressin and angiotensin II
- Krupina N.A., Orlova I.N., Lukyanova L.D.* Effect of course intake of bio-active flavonoids-containing plant preparation Extralife on the level of anxiety and sensorimotor reactivity in rats
- Kirova Yu.I.* Role of the glutathione system in regulation of redox status in the rat cerebral cortex under hypoxia
- Tregub P.P., Kulikov V.P., Stepanova L.A., Zabrodina A.S., Nagibaeva M.E.* The role of adenosine A<sub>1</sub> receptors and mitochondrial K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> channels in the mechanism of increasing the resistance to acute hypoxia in the combined effects of hypoxia and hypercapnia
- Silachev D.N., Mansikh V.N., Gulyaev M.V., Pevzner I.B., Zorova L.D., Babenko V.A., Plotnikov E.Y., Pirogov Y.A., Zorov D.B.* Pathological changes after brain ischemia are similar to those observed in Alzheimer disease
- Merkulov Y.A., Pyatkov A.A., Merkulova D.M.* Peculiarity of autonomic functions regulation remodeling in human adaptation to extreme conditions in labor activities
- Dzugkoev S.G., Mozhayeva I.V., Gigolaeva L.B., Tedtoeva A.I., Margieva O.I., Dzugkoeva F.S.* The changes in the biochemical indices of blood in cobalt intoxication on the background of the regulators of the expression of endothelial NO-synthase
- Kuznetsova E.I.* Neurotoxic the effects of chemotherapy on the function of the central nervous system in children with lymphoid tumors
- Giliano N.Y., Bondarev G.N., Konevega L.V., Noskin L.A., Zhurishkina E.V., Alchinova I.B.* Possible mechanism of the selective action of the inhibitors of glycolysis in the endothelial cells and the human carcinoma cells in the culture
- Abakumova T.V., Antoneeva I.I., Gening T.P., Gening S.O., Dolgova D.R., Fomina A.V.* Cytokines profile and metabolic activity of neutrophils of peripheral blood when progressing neoplasma
- Remizova M.I., Gerbut K.A., Grishina G.V., Nagornaya K.N.* Influence of the nitric oxide donors on the microcirculation in infusion therapy of the experimental hemorrhagic shock

## REVIEWS

- Reschetniak V.K., Kukushkin M.L., Gurko N.S.* The importance of the cortex and subcortical structures of the brain in the perception of acute and chronic pain
- Ivanov V.V., Shakhristova E.V., Stepovaya E.A., Nosareva O.L., Fedorova T.S., Novitsky V.V.* Molecular mechanisms of modulation of lipolysis in adipose tissue and development of insulinresistance in diabetes

## METHODS

- Saburina I.N., Kolokoltsova T.D., Kopyaev S.Yu., Zurina I.M., Borzenok S.A.* Experience of culturing anterior epithelial corneal cells from human eye ball
- Chausova S.V., Gurevich K.G., Bondareva G.P., Filatov O.Ju, Malyshev I.Y.* Possibility of diagnostics of the non-steroidal anti-inflammatory drugs intolerance with a change in the chemiluminescent glow of the polymorphonuclear leukocytes of the peripheral blood
- Shoibonov B.B., Kravchenko M.A., Baronets V.Y., Tolpygo S.M., Kostyeva M.V., Shabalina A.A., Zamolodchikova T.S., Kotov A.V., Panchenko L.F.* Estimation of atherogenic immune complexes containing modified lipoproteins in complement fixation tests

## ANNIVERSARY

- Paltsyn A.A.* The physician-philosopher — Donat Semenovich Sarkisov. To the 90 anniversary since birth

Гусев Е.Ю., Черешнев В.А.

## **Системное воспаление: теоретические и методологические подходы к описанию модели общепатологического процесса. Часть 4. Динамика процесса**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии УрО РАН,  
620049, Екатеринбург, ул. Первомайская, 106

*Системное воспаление (СВ) как общепатологический процесс можно рассматривать как развитие клеточного стресса в ответ на системное действие повреждающих факторов. Острое СВ характеризуется волнообразным течением — сменой фаз активации и торможения, а хроническое — последовательной сменой стадий его прогрессирующего развития. В зависимости от интенсивности действия системной альтерации и состояния противовоспалительных систем организма СВ можно классифицировать на три основных варианта развития: 1) «прорыв» — сверхострый процесс (например, молниеносный сепсис); 2) «продавливание» — относительно постепенный переход от классического к системному воспалению; 3) «застывание» — хроническое СВ. Динамика острого СВ характеризуется 5-ю фазами: развития, гиперергическими фазами первичного и вторичного флогогенного удара, разрешения и депрессивной фазой, которая типична для варианта «прорыв», характеризуется стратегией толерантности, а не резистентности, по отношению действию системных повреждающих факторов. Для оценки СВ целесообразно использование интегральных критериев (шкал), отражающих развитие не только системного воспалительного ответа, но и других частных процессов СВ: системного повреждения, микротромбообразования и других проявлений микроциркуляторных расстройств, полиорганную дисфункцию, дистресса нейроэндокринной системы.*

**Ключевые слова:** системное воспаление, фазы, стадии

Gusev E.Yu., Chereshnev V.A.

## **Systemic inflammation: theoretical and methodological approaches to description of general pathological process model. Part IV. A dynamics of the process**

Institute of Immunology and Physiology, UB RAS, Ekaterinburg, Russia, str.Pervomayskaya, 106

*Systemic inflammation (SI) as a general pathological process is considered as a development of cellular stress in response to systemic action of damage factors. An Acute SI is characterized by wavelike course (a changing of activation and inhibition phases); a chronic SI is characterized by successive changing of stages of its progressive development. SI may be classified into three variants which are depended on intensity of systemic alteration as well as on condition of anti-inflammatory systems: 1) a «break» is a fulminating process (e.g. fulminating sepsis), 2) a «caving» is a relatively gradual conversion of classical inflammation to systemic one; 3) a «sticking» is a typical chronic SI. An evolution of the acute SI is characterized by the 5 following phases: a development, hyperergic phases of the primary and the secondary phlogogenic impact, a resolution, and depressive phase. The last phase is a typical for the «break» variant and characterized by a tolerance, but not a resistance strategy to action of factors of systemic alteration. It is advisable to estimate SI with Integral Criteria (Scales), which reflect both of the development of a systemic inflammatory response and the following other particular processes of SI: the systemic alteration, the micro thrombosis and other microcirculatory disorders, multiple organ dysfunction, and a distress of the neuroendocrine system.*

**Key words:** systemic inflammation, phases, stages

воспалительной реакции (ССВР, SIRS) [4—8] мы провели в ряде других своих публикаций [3, 9—12]. По нашему мнению, используемые теоретические и методологические подходы для характеристики известных стадий ССВР малопригодны для описания модели типового патологического процесса.

Как общепатологический процесс СВ является динамичной системой, состоящей из множества более частных неустойчивых во времени типовых процессов [1, 9]. Они, в свою очередь, подразделяются на ещё менее интегральные составляющие (процессы 2-го, 3-го и т.д. порядков). Во избежание терминологической путаницы формирующие СВ процессы 1-го порядка мы обозначаем просто как феномены, а любые их более частные составляющие — как субфеномены [1, 9]. С этих позиций системная воспалительная реакция (СВР), ключевым проявлением которой является накопление в крови медиаторов воспаления, является одним из феноменов СВ (если конкретизировать это понятие). К другим феноменам можно отнести дистресс-реакцию нейроэндокринной системы (ключевой субфеномен — патологическая реактивность и дисфункция гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС), которая может быть связана с СВР в рамках процессоконтекста СВ, но и, конечно, быть компонентом процессов иной природы), микроциркуляторные расстройства (характерный субфеномен — системное микротромбообразование), системную альтерацию (субфеномены — системная тканевая альтерация, эндотоксинемия, «протеиназный взрыв» и др.), полиорганную недостаточность (ПОН), истощение буферных систем противовоспалительной резистентности [1, 9]. Динамика этих феноменов по отношению друг к другу, как правило, асинхронна и асимметрична. Кроме того, наличие каждого феномена в отдельности строго неспецифично к СВ, а их проявление при СВ носит вероятностный, но не атрибутивный характер. Отдельные феномены позволяют идентифицировать и характеризовать СВ только при их комплексном определении в виде интегрального критерия, формирующего целостный образ СВ. При этом «мозаика» сложного процессоконтекста СВ и выраженность его отдельных составляющих отличается нестабильностью и нелинейностью изменений во времени при конкретном наблюдении. Эти изменения уникальны в каждом отдельном случае, но для решения теоретических и практических задач их необходимо интегрировать в типовые варианты. Учитывая вышесказанное, для описания основных закономерностей динамики СВ необходимо, с нашей точки зрения, решить, как минимум, обозначенные ниже задачи.

### Выбор ключевого звена, определяющего динамику процесса

Динамика СВ определяется классическим для биологических процессов алгоритмом: «стимул → ответ». Иницилирующим стимулом в данном случае является первичная системная альтерация, связанная с этиологическими особенностями процесса (сепсис, острая травма, анафилактический шок, гемотранфузионный шок, эмболия околоплодными водами и т.д.).

«Ответ», в свою очередь, определяется развитием системного провоспалительного стресса различных типов клеток, прежде всего, микрососудов [1, 9]. Он реализуется в виде совокупности различных функциональных и дисфункциональных систем клеточного, тканевого и организменного уровня [1]. Интегрально развитие системного провоспалительного клеточного стресса можно зафиксировать по накоплению в крови медиаторов воспаления и других флогогенных факторов, определив этот феномен как СВР [3, 10, 13]. Между тем, клеточный ответ на воздействие различных повреждающих факторов может реализовывать не только стратегию резистентности (сопротивления) — гиперергическую провоспалительную реакцию, но и толерантности (привыкания) — гипоергического состояния гипобиоза, при доминирующей роли депрессивной стадии клеточного стресса [3, 9]. В последнем случае СВР не будет носить определяющего характера для идентификации СВ, а достижение этой цели потребует более тщательного анализа других феноменов СВ.

Состояние гипобиоза, как преддверие анабиоза, является общебиологическим феноменом: у микроорганизмов проявляется в подавлении пролиферативной активности [14], а у разных классов позвоночных развитие гипоергических состояний клеток может быть, как составной частью развития многих онтогенетических и адаптационных физиологических программ, так и провоспалительным ответом на действие повреждающих факторов различной природы [15, 16]. Несомненно, проявления клеточного гипобиоза могут иметь специфические особенности при воспалении, которые ещё предстоит детально охарактеризовать специалистам соответствующих областей знаний. Понятие «стимул» может включать две качественно различающиеся составляющие — это не только иницилирующее (первичное) системное повреждение, но и вторичная системная альтерация, связанная с определённым этапом развития СВ [1, 3, 9]. Вторичная системная альтерация является механизмом саморазвития СВ по принципу положительной обратной связи («стимул → ответ → стимул»). Она способствует формированию особых вариантов динамики СВ, которые прямо не зависят от особенностей первичного

этиологического воздействия. Этот порочный патогенетический круг во многом определяет необратимость острого СВ, то есть невозможность спонтанного выздоровления. Механизмами системной альтерации являются: снижение барьерной функции покровных тканей для микробных эндотоксинов, накопление в кровотоке продуктов тканевой деструкции, нарушение кислородного транспорта, ацидоз и вторичная гиповолемия на фоне микроциркуляторных расстройств, внутрисосудистая агрессия гидролаз, свободных радикалов, иных флоготенных факторов фагоцитов и другие механизмы повреждения, ассоциированные с эскалацией СВ [3, 9]. Схематично отражает динамику СВ алгоритм: «системная альтерация ↔ развитие системного клеточного стресса» [3], реализация которого на уровне организма проявляется в виде неоднородной динамики и множества вариантов взаимосвязи феноменов и субфеноменов СВ.

### Характеристика этапов развития системного воспаления

Под фазой можно понимать относительно однородный по своим проявлениям временной этап или фрагмент, в целом неоднородного процесса или системы. Стадия более конкретное понятие, отражающее определённую качественную ступень развития процесса. С позиции фазности целесообразно рассматривать наличие повторяемости определённых этапов (например, волнообразности изменений) или неопределённости, либо изменчивости вектора развития процесса. С позиции стадийности можно характеризовать динамику хронического СВ (ХрСВ), в то время как динамику острого СВ — скорее, с позиции фазности: возможность чередования гиперергических и гипоергических состояний, проспективная неопределённость смены фаз и исхода процесса в целом. Поэтому в большинстве случаев окончательную патогенетическую оценку динамики острого СВ можно дать только ретроспективно.

Динамику острого СВ нельзя однозначно характеризовать по степени органических дисфункций как проявлений несостоятельности многих компенсаторных механизмов. Сложность заключается в том, что в развитии ПОН участвуют не только патогенетические механизмы СВ, но и процессы иной природы [2, 17, 18]. При наличии значительных функциональных резервов даже очевидные проявления микроциркуляторных расстройств на тканевом уровне могут не сопровождаться неизбежным развитием шока и/или ПОН на уровне организма [1, 19]. В то же время, этапы развития СВ до проявления клинической картины критических состояний можно обозначить как субкомпенсированные, а при их наличии — как декомпенсированные. Необходимо учитывать и то, что,

как правило, СВ возникает не дискретно — возможны и пограничные состояния («серая зона») когда невозможно однозначно подтвердить или опровергнуть наличие СВ, и тем самым чётко дифференцировать СВ от системных проявлений классического воспаления. Такое состояние можно обозначить как пред-СВ и оно характерно для фаз развития и разрешения СВ, а также может формировать некоторые межфазовые промежутки (переходы) в фазной динамике очевидных проявлений СВ. Учитывая вышесказанное, мы выделяем 5 основных фаз острого СВ [9, 12, 17, 18]:

1. *Фаза развития СВ* — формирует переходный этап от классического воспаления (или момента первичного системного повреждения, например, при травме) к очевидным проявлениям СВ. Нередко в палатах интенсивной терапии пред-СВ может быть купировано без дальнейшего развития СВ. В менее благоприятном варианте фаза развития переходит в гиперергическую фазу флоготенного удара (ФФУ). Длительность фазы развития сильно зависит от того или иного типового варианта динамики СВ (см. ниже).

2. *Фаза первичного флоготенного удара* (первичная ФФУ) является «входными воротами» для очевидных проявлений СВ. Она характеризуется критическими уровнями СВР, в частности, выраженной гиперцитокинемией как за счет провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов [12, 17, 20]. Эта фаза может носить на начальном этапе своего развития субкомпенсированный характер, особенно, до проявления феномена вторичного системного повреждения. Основные варианты исхода первичной ФФУ:

- а) фаза разрешения (благоприятный вариант);
- б) фаза вторичного флоготенного удара — прогредившее течение или через межфазовые переходы по типу «светлого окна»;
- в) депрессивная фаза;
- г) летальный исход, особенно при быстром развитии тяжёлого шока.

3. *Фаза вторичного флоготенного удара* (вторичное развитие ФФУ при волновой динамике процесса) характеризуется феноменом вторичного системного повреждения, как правило, состоянием декомпенсации (ПОН). Исходы:

- а) большая вероятность летального исхода;
- б) фаза разрешения (благоприятный вариант);
- в) депрессивная фаза;
- г) дальнейшее волнообразное течение ФФУ.

4. *Депрессивная фаза (ДФ)* характеризуется относительно низкими уровнями показателей СВР независимо от их провоспалительной или противовоспалительной направленности, например, цитокинов [12, 17], всегда критическим для жизни состоянием —

клетки микрососудов не способны не только поддерживать гомеостатические физиологические функции, но и реагировать на воздействие повреждающих факторов. Вероятность проявления других феноменов СВ (кроме СВР) выше, чем при ФФУ. Исход, в большинстве случаев, летальный. В «классическом виде» ДФ наблюдается редко, чаще в виде тенденции, переходного состояния, формирующего межфазовые переходы.

5. Фаза разрешения устанавливается только ретроспективно, поскольку состояние «серой зоны» может быть завершающим этапом СВ при благоприятном его исходе (собственно, это и есть фаза разрешения СВ), но может быть и временным «светлым окном» между критическими фазами СВ при неблагоприятной динамике процесса.

Для характеристики стадий ХрСВ целесообразно учитывать прогрессирование морфофункциональных изменений со стороны внутренних органов, наличие определённых диапазонов возможных колебаний уровней СВР в рамках одного качественного состояния хронического процесса и наличие других феноменов СВ (см. ниже).

### Методологические подходы к оценке СВ

«На выходе» любой методологический подход должен определить основные магистральные пути формирования на альтернативной основе способов (конкретных методик и технологий) идентификации и характеристики принципиального образа СВ, но также того или иного варианта динамики СВ. В свою очередь, частные решения этих проблем сводятся к получению минимального по количеству, но достаточного по эффективности и доступности (экономической, технологической, степени стандартизации и обучаемости потенциальных потребителей) комплекса критериев. Между тем, выбор каждого конкретного критерия — это результат компромиссной оценки диагностической и патогенетической значимости выбираемого показателя, его конкретности и универсальности для определения частных процессов, устойчивости и мобильности при мониторинговании, взаимозаменяемости и взаимодополняемости в структуре интегрального комплекса критериев [13, 21].

Основным методологическим подходом к диагностике и характеристике СВ, как мы полагаем, является определение качественных уровней СВР или, иначе, уровней реактивности (УР), а также выявление наличия или отсутствия других ключевых феноменов СВ. С целью определения УР, учитывая неустойчивость и низкую корреляцию друг с другом отдельных показателей СВР, необходимо интегрировать не меньше 3 (лучше 5) этих показателей [13, 21]. Для каждого показателя, исходя из его патогенетической и диагно-

стической значимости, нужно предварительно установить и нормировать диапазоны концентраций в крови, обычно до 5—6 референтных интервалов, обозначенных баллами. Далее для получения значения УР в каждом конкретном наблюдении три наибольших по выраженности (в баллах) показателя суммируются и усредняются [13, 21].

Патогенетическое и диагностическое значение определения шкалы УР (0—5 баллов) [13, 21]:

- УР-0 — уровень нормы (отсутствие СВР);
- УР-1 — возможен при остром классическом воспалении, ХрСВ, но исключает острое СВ;
- УР-2 — нередко фиксируется при выраженном остром гнойном классическом воспалении (например, обширных флегмонах с поражением кожи и прилежащей мышечной ткани нижних конечностей [19]), но также и при ДФ, типичен для ХрСВ;
- УР-3 — может отмечаться при гиперергических вариантах острого классического воспаления и при гиперергических вариантах острого СВ (фазы развития и разрешения, ДФ), а также при ХрСВ;
- УР-4 — нетипичен для острого классического воспаления, возможен при особых гиперергических вариантах ХрСВ, типичен для первичной и вторичной ФФУ острого СВ;
- УР-5 — специфичен для ФФУ и обуславливает высокую вероятность критических её проявлений (ПОН и шок), как правило, не характерен для ХрСВ, практически исключает наличие классического воспаления, неосложнённого сопутствующим развитием СВ.

В настоящее время имеется широкий набор апробированных в практической медицине клинико-лабораторных показателей СВР, пригодных для расчета шкалы УР. С этой целью мы определяли в плазме крови пациентов иммунохемилюминесцентным методом («Immulite») концентрации 4-х цитокинов (интерлейкины — IL-6, IL-8, IL-10; фактор некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ )) и С-реактивного белка [13, 21].

Также имеется широкий спектр потенциальных показателей и других феноменов. Мы остановились на следующих критериях 4-х феноменов СВ, определяемых в плазме крови тем же методом («Immulite») [13, 21]:

- *дистресс-реакция ГГНС* (кортизол >1380 или <100 нмоль/л, для ХрСВ >690 нмоль/л);
- *системная альтерация* (миокардспецифичный тропонин I  $\geq 0,2$  нг/мл и/или миоглобин  $\geq 800$  нг/мл, для ХрСВ миоглобин  $\geq 60$  нг/мл);
- *микротромбообразование* (D-димеры  $\geq 500$  нг/мл как для острого СВ, так и для ХрСВ);
- признаки ПОН определялись по данным шкалы SOFA.

Эти критерии интегрировались в шкалу СВ (0—9 баллов) для характеристики острого СВ [10]: суммировались значения УР как критерии СВР (от 2 до 5 баллов, УР-0 и УР-1 — исключают острое СВ) с балльной оценкой других 4 феноменов — по 1 баллу при выявлении каждого из них. Шкала СВ линейно не отражает выраженность СВ, поскольку наиболее критическая фаза СВ — ДФ характеризуется сравнительно невысокими значениями УР (УР-2-3). Шкала СВ определяет: зону риска развития СВ или пред-СВ (диапазон 3—4 балла), наличие СВ ( $\geq 5$  баллов), ФФУ (УР-4-5 при наличии СВ), ДФ (УР-2-3 при наличии СВ и критичности состояния пациента), также эта шкала выявляет доминирующие феномены и может характеризовать отдельные межфазовые переходы при мониторинговании процесса.

По целому ряду причин для изучения СВ клинический материал имеет существенные преимущества перед данными экспериментальных исследований. Отчасти это связано с резко возросшей в последнее время информативностью малоинвазивных методов, используемых для прижизненного обследования пациентов, а также более широким спектром апробированных в клинике молекулярных показателей СВР и других феноменов СВ в сравнении с любым видом животных. Однако главное состоит в том, что для моделирования, к примеру, классического воспаления не возникает проблемы в идентификации и общей характеристике этого процесса у всех видов млекопитающих [2], начиная с классических внешних проявлений воспаления, впервые сформулированных Цельсом и Галеном. Напротив, для СВ, как было показано выше, решение этих задач требует комплексного использования значительного числа общеизвестных, стандартизованных молекулярных показателей, апробированных при различных патологиях (например, «реанимационных синдромах») и не привязанных к определённому этиологическому фактору, конкретному протоколу обследования пациентов или определённой экспериментальной модели у животных. Поэтому для каждого вида экспериментальных животных возникает необходимость установления общепринятых, универсальных (не специфичных к конкретным моделям) критериев СВ, сопоставимых по биологической значимости с критериями СВ у человека. Между тем, необходимость разработки для животных комплексных критериев общепатологического процесса очевидна для решения фармакологических и других экспериментальных задач, выходящих за рамки частных исследований отдельных проявлений и механизмов СВ.

Еще более сложной проблемой является изучение ХрСВ и не только у животных (что естественно), но и у человека. Хронический вариант развития СВ не

является декомпенсированным процессом в отношении микроциркуляторных расстройств — отсутствия синдрома ПОН, критических проявлений коагулопатии потребления и шоковых состояний. Между тем нарастающие проявления хронических органных дисфункций на фоне постепенных морфологических изменений паренхиматозных органов свидетельствуют о возможном состоянии субкомпенсации. Анализ этих изменений, определение их связи с ХрСВ, дифференциация от факторов, не входящих в процессоконкомплекс ХрСВ, и представляет очевидную проблему. Другой сложностью изучения ХрСВ является неустойчивость СВР, которая полностью не отменяется даже при использовании интегральных критериев (шкала УР). Если колебания УР определяют наличие фаз острого процесса, имеющих различное патогенетическое содержание, то для оценки ХрСВ они нередко являются «информационным шумом», затрудняющим его идентификацию. Для решения этой проблемы при мониторинговании процесса возникает необходимость в формализации *степеней выраженности СВР* — определённых диапазонов колебаний УР, например, при двух-трёх кратном исследовании в течение 1—2 недель [22, 23]. С учётом степени изменения СВР и наличия других феноменов мы предлагаем следующую классификацию *стадий ХрСВ* [22, 23]:

- *0-я стадия* (риска развития ХрСВ) — наличие аутоиммунных, хронических деструктивных инфекционных и соматических заболеваний при наличии умеренных проявлений СВР (максимальные колебания УР до 1-го балла — *1-я степень СВР*), но отсутствие других феноменов ХрСВ;
- *1-я стадия* (пограничная) — наличие СВР (колебания УР до 2-х баллов — *2-я степень СВР*) и одного-двух других феноменов ХрСВ, кроме системного тканевого повреждения;
- *2-я стадия* (неустойчивой компенсации) — наличие при мониторинговании процесса более высоких значений УР (до 3 баллов — *3-я степень СВР*) или до УР-2 при наличии феномена системной тканевой альтерации;
- *3-я стадия* (субкомпенсации) — наличие взаимосвязи признаков 2-й стадии ХрСВ с прогрессирующим морфофункциональным нарушением внутренних органов или колебаний УР до  $\geq 4$  баллов (*4-я степень СВР*), подтверждающих субкомпенсированный характер хронических микроциркуляторных расстройств.

Такой подход возможен для оценки состояния отдельных пациентов, но трудно применим для группового анализа различных патологий, при которых нередко приходится ориентироваться на результаты однократных исследований. С этой целью мы предла-



гаем шкалу  $X_pCB$  (0—8 баллов) [24], основанную на тех же принципах, что и шкала  $CB$ : баллы  $УР$  суммируются (кроме  $УР-0$ ) с баллами феноменов  $CB$  (кроме  $ПОН$ ) по принципу «1 выявленный феномен — 1 балл». При этом высокая вероятность наличия  $X_pCB$  при однократном исследовании фиксируется при 3 и более баллах шкалы  $X_pCB$ . Разумеется, получаемые результаты будут отличаться определённой степенью приближенности, поскольку шкала  $X_pCB$  фиксирует только очевидные проявления  $X_pCB$  (при отсутствии острого воспаления), и у части пациентов будет игнорировать возможное наличие 1-й стадии  $X_pCB$ .

В целом, распознавание и общая характеристика системного воспаления требует выбора из большого количества частных показателей процессокомплекса относительно ограниченного числа наиболее информативных критериев, отражающих основные феномены процесса. Базовый набор критериев может строиться на альтернативных началах, но все эти варианты должны быть сопоставимы по диагностической ценности и патогенетическому смыслу. При необходимости базовая схема может быть расширена для решения частных теоретических задач или интегрирована с протокольными критериями синдромальных и нозологических моделей. Одним из условий успешного использования интегральных критериев типового патологического процесса в клинической практике является широкое внедрение информационных технологий, основанных на использовании программ компьютерных сетей и электронных баз данных [25, 26].

### Основные типовые варианты динамики системного воспаления

Классическое воспаление по своим проявлениям, также, как и  $CB$ , является неоднородным процессом, который можно подразделить на несколько основных типовых вариантов: экссудативное или серозное, экссудативно-деструктивное (гнойное), продуктивное или пролиферативно-клеточное воспаление, которое, в свою очередь, можно подразделить на преимущественно эозинофилоцитарное (при метазойной инфекции или некоторых аллергических процессах), мононуклеарное, смешанное. Все эти варианты в значительной степени определяются клеточным составом воспалительного инфильтрата в очаге воспаления. Изменения состава и функциональной активности этих клеток, в свою очередь, определяют эффективность воспаления в отношении устранения повреждающего фактора.

Для  $CB$  этот принцип классификации непригоден, поскольку клеточный состав ключевых тканевых участников процесса (прежде всего, микрососудов) относительно стабилен. При  $X_pCB$  можно обоснованно

[27] предположить наличие системной мононуклеарной инфильтрации зоны микроциркуляции без привязки к конкретной нозологии, но и в этом случае говорить об атрибутивной патогенетической роли этого процесса при  $X_pCB$ , как минимум, преждевременно.

Сравнительный анализ различных патологий с использованием интегральных критериев  $CB$  [10, 12, 13, 17, 18, 19, 21] позволило нам выделить три основных типовых варианта развития  $CB$ , исходя из соотношения интенсивности системной альтерации, состояния буферных систем противовоспалительной резистентности и провоспалительного ответа на уровне целостного организма, а именно:

- 1) «прорыв»;
- 2) «продавливание» (для острого  $CB$ );
- 3) «застревание» (для  $X_pCB$ ).

Таким образом, типовые варианты развития  $CB$  определяется не сменой клеточного состава «зоны воспаления», а силой воздействия первичных повреждающих факторов и особенностями преодоления ими эшелонированных барьеров противовоспалительной резистентности на системном уровне.

**Вариант 1 — «прорыв»** (рис. 1). Сверхострый процесс, мощное, нередко импульсное действие повреждающего фактора на системном уровне. Буферные системы противовоспалительной резистентности «преодолеваются сходу». Между действием первичных и вторичных факторов системного повреждения нет существенного временного диапазона. Основные события, характеризующие динамику процесса, развиваются в течение нескольких часов от момента действия первичного повреждающего фактора. Этот мо-

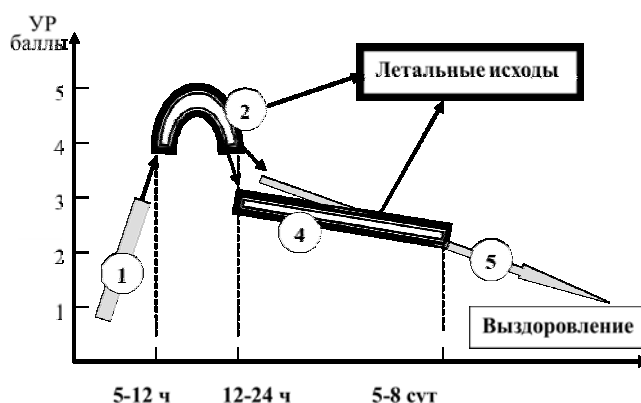


Рис. 1. Динамика фаз развития  $CB$  при варианте «прорыв». В кружках — номера фаз  $CB$ . 1-я — фаза развития  $CB$ , 2-я — фаза первичного флогогенного удара, 4-я — депрессивная фаза, 5-я — фаза разрешения, развитие 3-й фазы — вторичного флогогенного удара менее вероятно в сравнении с вариантом «продавливание» (поэтому на рисунке она отсутствует). Расположение на рис. 1 и 2 обозначения исходов процесса не связано со значениями  $УР$  на шкале ординат.

мент, как правило, четко фиксируется, как и сама природа инициирующего повреждающего фактора.

Динамика процесса характеризуется скоротечностью: в течение 3—12 ч (в зависимости от интенсивности действия повреждающего фактора) развивается ФФУ (как правило, с УР-5 — тысячекратными превышениями верхних уровней нормы провоспалительных цитокинов), на фоне тяжёлого шока с высокой вероятностью летального исхода в этот временной период. Выжившие пациенты сталкиваются с другой проблемой — развитием к концу первых суток депрессивной фазы СВ, а именно, крайне критического состояния на фоне незначительного провоспалительного ответа клеток на системном уровне (в плазме крови концентрации индикаторных цитокинов превышают только в десятки раз предельно допустимые значения нормы), но не с меньшей вероятностью летального исхода на фоне резистентности процесса к лечебным эффектам интенсивной терапии. Длительность этой фазы может составлять несколько суток. При этом возможны волнообразные колебания: УР-2 ↔ УР-3, но повторный выход процесса в ФФУ (УР-4-5) маловероятен ввиду эффекта «функционального нокаута» большого числа клеток организма.

В нашей базе данных имеется 7 случаев мониторинга развития очевидных проявлений ДФ при варианте «прорыв» (три из них — эмболия околоплодными водами), все закончились летальным исходом. В ряде других случаев определить ДФ было невозможно по причине более раннего наступления *mortis* — в первые часы процесса на пике ФФУ. Также причиной, осложняющей мониторинг варианта «прорыв», является внезапность, непредсказуемость процесса, запаздывание начала мониторинга,

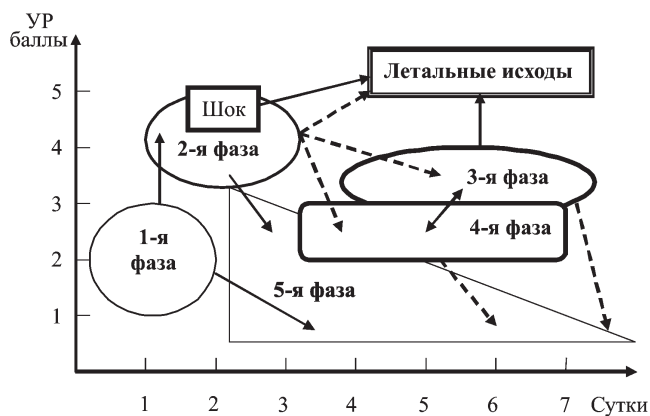


Рис. 2. Динамика фаз развития СВ при варианте «продавливание». Фазы СВ: 1-я — фаза развития СВ, 2-я — первичного флогогенного удара, 3-я — вторичного флогогенного удара, 4-я — депрессивная фаза, 5-я — фаза разрешения. Сплошные стрелки — наиболее вероятные направления развития СВ, пунктирные — менее вероятные. Фаза 1 может быть и более длительной.

в последнем случае часто упускается кратковременная (несколько часов) ФФУ. Другие выявленные причины варианта «прорыв» — острые травмы, интраоперационное повреждение крупной артерии при операции и один случай молниеносного сепсиса (в последнем случае смену всех основных фаз СВ мы зафиксировать не успели ввиду скоротечности процесса).

Иные теоретически возможные причины развития варианта «прорыв»: краш-синдром, анафилактический шок, гемотрансфузионный шок и подобные им по динамике критические состояния другой этиологии — пока остаются за пределами наших наблюдений, но перспективны для дальнейшего исследования.

Вариант 2 — «продавливание» (рис. 2). Это типичный, наиболее массовый вариант развития острого СВ, включая подавляющее большинство случаев гнойно-септических осложнений. Он характеризуется относительно плавным переходом классического воспаления в СВ. При этом факторы первичного повреждения в течение нескольких суток «продавливают» барьеры противовоспалительной резистентности на системном уровне. Таким образом, генерализация клеточного провоспалительного стресса и других базовых программных механизмов, предназначенных для использования в очаге воспаления, но не за его пределами, происходит постепенно.

Для этого типового варианта СВ характерен относительно длительный начальный период неопределённости, когда нельзя четко ни подтвердить, ни исключить наличие СВ (пред-СВ) в виде фазы развития СВ. В некоторых случаях фаза развития сопровождается выявлением критериев СВ ( $\geq 5$  баллов шкалы СВ), но не более критических фаз СВ (ФФУ, ДФ). На этом этапе процесс СВ можно характеризовать как субкомпенсированный до развития феномена вторичного системного повреждения и развития критических осложнений.

Продолжительность следующей, более опасной фазы СВ, ФФУ при варианте «продавливание», примерно, 1—3 суток, и её дальнейшее развитие зависит от наличия или отсутствия феномена вторичного системного повреждения. Эта фаза (ФФУ), в отличие от ДФ, может развиваться без проявления ПОН у некоторых пациентов, имеющих исходно значительные функциональные резервы. При пролонгации СВ (нередко на 5—8 сутки процесса) ФФУ может развиваться вторично, с ещё большей вероятностью развития ПОН и летального исхода в сравнении с первичной ФФУ. В этот же временной период возможно развитие и ДФ, но, как правило, она проявляется менее отчётливо, чем при варианте «прорыв». Между тем, очевидные проявления ДФ (табл. 1) нам приходилось наблюдать при пролонгированном течении сепсиса, а именно, при развитии

третичного перитонита (через 1—6 нед. от начала манифестации вторичного перитонита). Таким образом, при варианте СВ «провыв» процесс «врывается» в ДФ, а при варианте «продавливание», скорее, в эту фазу «вползает».

*Вариант 3 — «застревание».* Этот вариант типичен для ХрСВ: характеризуется отсутствием критических проявлений микроциркуляторных расстройств (шок, ПОН); относительно устойчивым соотношением пролонгированного действия факторов системной альтерации и состоянием систем противовоспалительной резистентности («застревание» факторов повреждения в буферных системах противовоспалительной резистентности). Процесс в этом случае может быть связан с постепенным накоплением морфофункциональных изменений внутренних органов (атрофия, склероз, уменьшение паренхимы). Феномен вторичной системной альтерации в целом не характерен; прогрессирование процесса связано больше с пролонгацией действия факторов первичного повреждения и сопровождается относительно постепенным переходом на более высокие качественные уровни патологических системных изменений (стадийностью процесса).

Таким образом, для данного варианта СВ характерно длительное и относительно (в сравнении с острым СВ) малоинтенсивное действие факторов первичной системной альтерации (инфекция, коагулопатия, иммунокомплексная патология, генерализация продуктов тканевого распада при хронических ишемиях, контакт крови с инородной поверхностью при программном гемодиализе, различные интоксикации и др.). Проявления СВР и других феноменов при ХрСВ, в целом, менее выражены, чем при остром СВ, что требует при оценке ХрСВ использовать скорректированные, с учётом специфики процесса, критерии (см. выше). Другой особенностью ХрСВ является отсутствие чётких общеизвестных клинических ориентиров, характерных для острого СВ: развитие тяжёлого шока и других очевидных клинических проявлений системных микроциркуляторных расстройств.

При различных хронических заболеваниях можно наблюдать те или иные латентные изменения в системе микроциркуляции крови (компенсированные или субкомпенсированные), прогрессирование процессов атрофии, склероза паренхиматозных органов и хронической органной недостаточности. Однако причины этих изменений поливалентны. Для конкретизации патогенетической роли в этих изменениях рассматриваемого типового процесса необходимы междисциплинарные (общепатологические), стандартизованные подходы для проведения многолетних, эпидемиологических, проспективных исследований в различных об-

ластях медицинской практики. В настоящее время эти подходы даже не определены официально. Также отсутствуют общепринятые представления о природе и патогенезе ХрСВ, а сам термин «хроническое системное воспаление» в медицинской практике обычно ассоциируется с теми или иными количественными проявлениями СВР при хронических заболеваниях (цитокинемия, острофазный ответ, признаки оксидантного стресса, внутрисосудистой активации фагоцитов и др.) без их качественной комплексной оценки с позиции общепатологического процесса. Учитывая вышесказанное, в настоящее время любые концепции ХрСВ имеют предварительный и ориентировочный характер, а какие из них выдержат испытания на практике и в каком виде, покажет время.

### Анализ примеров использования интегральных критериев СВ

Сравнительный анализ интегральных критериев (включая УР) острого СВ у реанимационных пациентов и ХрСВ соответственно представлен в табл. 1 (по данным шкалы СВ) и табл. 2 (шкалы ХрСВ). Группы пациентов с острыми воспалительными заболеваниями, не требующих интенсивной реанимационной терапии, в данном случае мы не анализировали ввиду того, что наличие критериев СВ для них нехарактерно [17, 19]. Также мы, с целью упрощения представляемых данных, не фиксируем проявления других феноменов СВ, этот анализ и в тех же группах представлен в другой публикации [19]. Учитывая вышесказанное, остановимся на основных закономерностях межгруппового анализа.

Практически у всех «реанимационных» пациентов (кроме группы «травма 10-е сут.» и, частично, «травма 5-е-7-е сутки с ПОН и без ПОН») выявляются малоспецифичные к критичности состояния критерии синдрома СВР ( $\geq 2$  критериев) [17—19]. Между тем, острое СВ как типовой патологический процесс (по данным шкалы СВ) выявляется у большинства пациентов только в группах с признаками ПОН — от 67% до 100% (в 2 группах септического шока). В группах без ПОН проявления СВ отмечаются реже, при преобладании переходных (субкомпенсированных) фаз — развития и обратимого варианта ФФУ (до развития феномена вторичного системного повреждения). Последнее наглядно иллюстрирует группа «операции на открытом сердце» (протезирование клапанов) — здесь характерны высокие значения СВР (УР-4-5) при отсутствии послеоперационных осложнений. Данная группа характеризуется управляемым (контролируемым в процессе операции) повреждением и подтверждает возможность обратимости начальных этапов ФФУ при оказании адекватной и своевременной медицинской помощи.

Наиболее существенные отличия в выявлении СВ отмечаются при сопоставлении групп с ПОН и без ПОН (сепсис, травма) на 5-е—7-е сут. процесса, что связано с развитием у части пациентов к этому времени феномена вторичного системного повреждения.

Проявления септического шока при затяжном процессе (третичный перитонит) среди анализируемых групп характеризуются относительно низкими уровнями СВР, преобладанием ДФ и наиболее высокой частотой летального исхода (94%).

Особенностью наиболее критических случаев группы «массивная акушерская кровопотеря» с развитием геморрагического шока и его перерастанием в устойчиво критическое состояние (ПОН >1 сут.) является наличие в части случаев варианта СВ «прывыв», что требует для характеристики СВ мониторинга процесса уже на протяжении 1-х сут. Между тем, даже при межгрупповом анализе (на основании однократных измерений) видна роль критических значений СВР (УР-5 — 38%), а у части пациентов фиксируется и ДФ.

Общее число летальных исходов в группах «реанимационных» пациентов — 82, из них признаки СВ (по данным шкалы СВ) были выявлены в 92,7% случаев. Эти результаты в полной мере отражают степень критичности СВ как доминирующего общепатологического процесса, определяющего тяжесть состояния и летальные исходы.

При анализе хронических заболеваний необходимо учитывать то, что шкала ХрСВ, как уже отмечалось, выделяет случаи только с наиболее вероятными проявлениями ХрСВ. Кроме того, в целом, группы пациентов строго не рандомизировались и их состав, примерно, соответствовал обычному соотношению вариантов течения и лечения этих заболеваний по г.Екатеринбургу. Таким образом, цель исследования — представить наиболее общую, принципиальную картину возможного развития ХрСВ как типового патологического процесса, но не частных вариантов патогенеза соответствующих нозологий, поскольку это является уже скорее клинической задачей и требует соответствующих методологических подходов.

Учитывая вышесказанное, исследуемые заболевания (табл. 2) можно разделить на 4 класса по степени вероятности развития ХрСВ:

*0-класс* включает пациентов с климактерическим синдромом, аутоиммунным тиреоидитом, хроническим аднекситом, реципиентов с нормальной функцией почечного трансплантата и характеризуется отсутствием явных признаков ХрСВ: преимущественно УР-0, реже — УР-1, как правило, отсутствие других феноменов ХрСВ [19, 22, 23].

• *1-й класс* (хроническая сердечная недостаточность, псориатический артрит, клапанная болезнь сердца, реактивный артрит, алкилозирующий спондилит, затяжные флегмоны нижних конечностей) ха-

Таблица 1  
Частотное распределение УР, выявление острого СВ (шкала СВ ≥5 баллов) и летальных исходов (ЛИ) у «реанимационных» пациентов

| Группы   | n  | УР (%) |      |      |      |      |      | СВ (%) | ЛИ (%) |
|--|----|--------|------|------|------|------|------|--------|--------|
|  |    | 0      | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    |        |        |
| Доноры крови, 18—55 лет                                | 50 | 100    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0      | —      |
| Операции на открытом сердце, 1-е сутки                 | 17 | 0      | 0    | 0    | 41,2 | 29,4 | 29,4 | 41,2   | 0      |
| Травма 1-е сут. без ПОН                                | 37 | 0      | 10,8 | 43,3 | 32,4 | 10,8 | 2,7  | 37,8   | 0      |
| Травма 1-е сут. с ПОН                                  | 38 | 0      | 2,6  | 21,1 | 39,5 | 34,2 | 2,6  | 78,9   | 26,3   |
| Травма 5—7 сут. без ПОН                                | 45 | 0      | 15,6 | 57,8 | 24,4 | 2,2  | 0    | 8,9    | 0      |
| Травма 5—7 сут. с ПОН                                  | 15 | 0      | 6,7  | 33,3 | 26,7 | 33,3 | 0    | 66,7   | 60     |
| Травма 10 сутки без ПОН                                | 21 | 9,5    | 33,3 | 42,9 | 14,3 | 0    | 0    | 0      | 0      |
| Сепсис без ПОН 1—2 сут.                                | 31 | 0      | 0    | 22,6 | 61,3 | 16,1 | 0    | 29,0   | 0      |
| Сепсис с ПОН 1—2 сут.                                  | 46 | 0      | 4,3  | 10,9 | 41,3 | 30,4 | 13,1 | 73,9   | 23,9   |
| Сепсис без ПОН 5—7 сут.                                | 12 | 0      | 33,3 | 50   | 16,7 | 0    | 0    | 0      | 0      |
| Сепсис с ПОН 5—7 сут.                                  | 13 | 0      | 0    | 7,6  | 46,2 | 46,2 | 0    | 92,3   | 30,8   |
| Септический шок 1—3 сут.                               | 14 | 0      | 0    | 7,1  | 14,3 | 42,9 | 35,7 | 100    | 78,6   |
| Третичный перитонит, с ПОН, но без шока                | 34 | 0      | 0    | 14,7 | 64,7 | 17,7 | 2,9  | 85,3   | 29,4   |
| Третичный перитонит, ПОН + шок                         | 17 | 0      | 0    | 35,3 | 58,8 | 5,9  | 0    | 100    | 94,1   |
| Массивная акушерская кровопотеря без шока <sup>1</sup> | 13 | 0      | 7,7  | 61,5 | 23,1 | 7,7  | 0    | 7,7    | 0      |
| То же + шок и ПОН <sup>2</sup>                         | 13 | 0      | 7,7  | 15,4 | 30,8 | 7,7  | 38,4 | 92,3   | 53,8   |

Примечание. <sup>1</sup> — исследование здесь и в группе <sup>2</sup> проводили в течение первых суток от момента кровопотери; <sup>2</sup> — к концу 1-х суток процесса сохранялся шок и ПОН, а в группе <sup>1</sup> признаки ПОН быстро купировались.

рактируется невысокой вероятностью (до 20%) преимущественно пограничных проявлений ХрСВ (1-я стадия).

- 2-й класс (ревматоидный артрит, хроническая дисфункция почечного трансплантата) формирует «серую зону» между 1-м и 3-м классами:

- наличие ХрСВ фиксируется в диапазоне 20—50% случаев;

- признаки микротромбообразования определены в 54,8% при ревматоидном артрите и 30,4% — при хр. дисфункции почечного трансплантата [19, 22—24];

- у некоторых пациентов этих групп отмечаются признаки дистресса ГТНС и вторичной системной альтерации [19, 22, 23].

- 3-й класс (системная красная волчанка (СКВ), необратимая атеросклеротическая ишемия нижних конечностей, терминальная почечная недостаточность с использованием управляемого гемодиализа) характеризуется:

- высокой вероятностью развития ХрСВ (>50%);

- доминированием очевидных проявлений ХрСВ (2 и 3 стадия);

- СВР находится преимущественно в диапазоне 2—3 баллов шкалы УР, но выявляются и УР>3 баллов (при СКВ — 38,8%);

- во всех 3-х группах более чем в 40% случаев наблюдаются системные признаки микротромбообразования;

- характерна относительно более высокая вероятность выявления критериев дистресса нейроэндок-

ринной системы в сопоставлении с заболеваниями 1-го и 2-го класса, а у некоторых пациентов выявляются и маркеры вторичной системной альтерации [19, 22, 23, 24].

В целом, при ХрСВ проявления СВР, в сравнении с острым СВ, менее выражены — УР, как правило, 1—3 балла, за исключением СКВ, где течение ХрСВ у ряда больных напоминает растянутую по времени ФФУ. Так, наибольшие уровни провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ ) в крови нам удалось выявить, как ни странно, не у пациентов с септическим шоком и другими острыми патологиями, а именно при СКВ [22, 23]. Вероятно, в этих случаях равновесное состояние между факторами системной альтерации с одной стороны и адаптивно измененными системами противовоспалительной резистентности — с другой, может достигаться и на фоне выраженного системного клеточного стресса при субкомпенсированном течении СВ в целом (отсутствие критических для жизни микроциркуляторных расстройств).

Критерии идентификации острого СВ (шкала СВ) в целом специфичны для острых реанимационных состояний, но не хронических заболеваний, за исключением СКВ (26% пациентов имеют  $\geq 5$  баллов по шкале СВ), ещё по одному такому случаю выявлено в других 2 группах 3-го класса хронических заболеваний.

Определённый интерес представляет сравнительный анализ пациентов с терминальной почечной недо-

Таблица 2

Частотное распределение УР и вероятностных проявлений ХрСВ (шкала ХрСВ  $\geq 3$  балла) в группах пациентов (%)

| Группы   | n  | УР   |      |      |      |      |     | Хр.СВ |
|--|----|------|------|------|------|------|-----|-------|
|  |    | 0    | 1    | 2    | 3    | 4    | 5   |       |
| Нормальная функция почечного трансплантата                     | 24 | 58,3 | 25,0 | 16,7 | 0    | 0    | 0   | 0     |
| Аутоиммунный тиреозит  | 29 | 79,3 | 20,7 | 0    | 0    | 0    | 0   | 0     |
| Климактерический синдром                                       | 16 | 93,7 | 6,3  | 0    | 0    | 0    | 0   | 0     |
| Хронический аднексит   | 16 | 75,0 | 25,0 | 0    | 0    | 0    | 0   | 0     |
| Хр. сердечная недостаточность 2—3 ст., у пациентов >65 лет     | 49 | 53,1 | 36,7 | 10,2 | 0    | 0    | 0   | 2     |
| Затяжные флегмоны голени у солдат                              | 42 | 19   | 78,6 | 2,4  | 0    | 0    | 0   | 7,1   |
| Псориатический артрит  | 12 | 33,3 | 50   | 16,7 | 0    | 0    | 0   | 8,3   |
| Анкилозирующий спондилит                                       | 27 | 44,5 | 33,3 | 22,2 | 0    | 0    | 0   | 11,1  |
| Клапанная болезнь сердца                                       | 15 | 53,5 | 33,3 | 13,2 | 0    | 0    | 0   | 13,3  |
| Реактивный артрит  | 30 | 46,7 | 33,3 | 20   | 0    | 0    | 0   | 20    |
| Ревматоидный артрит  | 42 | 31,0 | 47,6 | 19,0 | 2,4  | 0    | 0   | 31    |
| Хр. дисфункция почечного трансплантата                         | 23 | 8,7  | 69,6 | 17,4 | 4,3  | 0    | 0   | 43,5  |
| Атеросклеротические стенозы бедренной артерии <sup>1</sup>     | 38 | 5,3  | 31,6 | 52,6 | 10,5 | 0    | 0   | 57,9  |
| Системная красная волчанка                                     | 49 | 8,2  | 4,1  | 16,3 | 32,6 | 34,7 | 4,1 | 75,5  |
| Терминальная почечная недостаточность (программный гемодиализ) | 42 | 4,8  | 16,6 | 54,8 | 21,4 | 2,4  | 0   | 88,1  |

Примечание. <sup>1</sup> — в период подготовки к высокой ампутации нижней конечности

статочностью (3-й класс), хронической дисфункцией почечного трансплантата (2-й класс) и нормальной функцией почечного трансплантата (0-й класс). Так, в условиях купирования действия факторов системной альтерации (контакт крови с инородной поверхностью при гемодиализе и факторов, ассоциированных с почечной недостаточностью) и проведения стандартной иммуносупрессорной терапии (после трансплантации почки) процесс ХрСВ обратим (стадия ремиссии) при нормальном функционировании трансплантата, но только отчасти — при развитии дисфункции трансплантата [24]. При этом, по крайней мере, в 2 случаях признаки ХрСВ предшествовали развитию дисфункции трансплантата, поскольку окончательно группы формировались через 3—6 мес. после однократного обследования пациентов с почечным трансплантатом, а всего было зафиксировано 3 случая перехода из группы «норма» в группу «дисфункция трансплантируемой почки». Как известно [24], причины развития хронической дисфункции почечного трансплантата поливалентны, но среди этих причин, в настоящее время, ХрСВ практически не учитывается.

Таким образом, системное воспаление как общепатологический процесс лежит в основе патогенеза наиболее критичных для жизни острых патологий. На начальных этапах своего развития острое СВ может быть купировано методами интенсивной терапии. Однако более поздние фазы СВ, связанные с феноменом вторичного системного повреждения, более резистентны к проведению реанимационных мероприятий.

Хроническое системное воспаление характерно для тяжёлых, деструктивных заболеваний при пролонгированном, но субкомпенсированном эффекте системного повреждения. Причины этого эффекта разнообразны: аутоиммунный процесс, систематический контакт крови с инородной поверхностью (программный гемодиализ), краш-подобный феномен (критическая ишемия нижних конечностей) и др.

### **Заключение**

По мере накопления данных относительно молекулярных механизмов патогенеза, возрастающей детализации методов клиничко-лабораторной диагностики, протоколов лечения и постоянно возрастающего числа синдромов со своими особенностями ведения пациентов, возникает необходимость к более широкому рассмотрению универсальных проявлений патогенеза с позиции общепатологических процессов. Особенно это актуально при наличии у пациента сложных комбинаций нескольких нозологий и мультисиндромных патологий (что не является редкостью), где выбор основного заболевания или синдрома и, соответствен-

но, формирование протокола ведения пациента носит подчас ситуационный характер.

Общеизвестную роль в понимании патогенеза, создании большинства нозологических моделей и большого числа синдромальных моделей сыграло фундаментальное учение о воспалении с позиции общей патологии, которое последовательно развивалось на протяжении более столетия по мере прогресса различных отраслей молекулярной биологии и медицины, генетики, иммунологии, медицинской математики и других фундаментальных научных дисциплин. Одновременно в последнее время обозначился относительно широкий круг патологий, а именно, различных острых критических состояний и наиболее тяжело протекающих хронических заболеваний, где известные классические представления о воспалении как общепатологическом процессе имеют ограниченное значение, несмотря на доминирующую роль «воспалительных» механизмов в патогенезе этих патологий на системном уровне. Возникла объективная необходимость рассмотрения системного воспаления в качестве самостоятельного варианта типового патологического процесса и его дифференциации от классического воспаления. При этом ранее полученные данные молекулярных исследований «воспалительных» механизмов в значительной степени могут быть использованы и при формировании модели СВ, но при их «переструктурировании» в соответствующую систему координат альтернативной модели общепатологического процесса.

В отличие от классического воспаления, системное воспаление не имеет атрибутивных внешних проявлений. Для идентификации сложного, динамично меняющегося процессоконтекста системного воспаления необходим тот или иной набор интегральных клиничко-лабораторных критериев, способных отразить основные черты его патогенетического образа.

Динамика и соотношение фаз развития острого системного воспаления в существенной степени зависят от соотношения силы иницирующего процесса системного повреждения и состояния буферных систем противовоспалительной резистентности, а также возникновения феномена вторичного системного повреждения.

Изучение хронического варианта системного воспаления неизбежно потребует междисциплинарных, эпидемиологических проспективных исследований и разработки единых методологических подходов для его идентификации при различных нозологиях. Эти исследования позволят определить вклад рассматриваемого общепатологического процесса в развитие морфофункциональных изменений, включая и прогрессирование хронических органических дисфункций при

многих тяжело протекающих заболеваний независимо от их этиологии.

В отличие от классического воспаления, системное воспаление является не атрибутивным признаком патогенеза «воспалительных» заболеваний, но скорее возможным осложнением их течения.

С практической точки зрения модель системного воспаления может выполнять такую же роль (с учётом специфики процесса) по отношению к клиническим дефинициям, что и модель классического воспаления, то есть формировать теоретическую и методологическую основу для построения зависимых от него нозологических и синдромальных моделей.

*Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований УрО РАН, проект 12-У-4-1018.*

### Список литературы

1. Гусев Е.Ю., Черешнев В.А. Системное воспаление: теоретические и методологические подходы к описанию модели общепатологического процесса. Часть 1. Общая характеристика процесса. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2012; 4: 3-14.
2. 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: 4-14.
3. 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.
4. Balk R.A. Severe sepsis and septic shock. Definitions, Epidemiology and Clinical Manifestations. *Crit. Care Clin.* 2000; 16 (2): 214-26.
5. Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.V., Dellinger R.P., Fein A.M., Knaus W.A. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*. 1992; 101 (6): 1644-55.
6. Bone R.C. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit. Care Med.* 1996; 24 (7): 1125-8.
7. Meeran H., Messent M. The systemic inflammatory response syndrome. *Trauma*. 2001; 3: 89-100.
8. Vincent J.-L., Byl B. Defining a clinical syndrome of systemic inflammation. *Sepsis*. 2000; 4: 15-9.
9. Гусев Е.Ю., Черешнев В.А., Юрченко Л.Н. Системное воспаление с позиции теории типового патологического процесса. *Цитокины и воспаление*. 2007; 6 (4): 9-21.
10. Гусев Е.Ю., Зотова Н.В. Сепсис и теория системного воспаления. *Клиническая анестезиология и реаниматология*. 2009; 6 (1): 20-7.
11. Черешнев В.А., Гусев Е.Ю., Зотова Н.В. Фундаментально-прикладные аспекты системного воспаления с позиции теории физиологических и типовых патологических процессов. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2010; 96 (7): 696-707.
12. Черешнев В.А., Гусев Е.Ю. Иммунологические и патофизиологические механизмы системного воспаления. *Медицинская иммунология*. 2012; 14 (1-2): 9-20.
13. Гусев Е.Ю., Юрченко Л.Н., Черешнев В.А., Зотова Н.В. Методология изучения системного воспаления. *Цитокины и воспаление*. 2008; 7 (1): 15-23.
14. Oliver J. D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2010; 34 (4): 415-25.
15. Blicher A., Wodzinska, K., Fidorra, M. Winterhalter M., Heimburg T. The Temperature Dependence of Lipid Membrane Permeability, Its Quantized Nature, and the Influence of Anesthetics. *Biophysical Journal*. 2009; 96 (11): 4581-91.
16. Sokolova T.N. The hypothesis of specific affinity of metabolic pathways inherent to onset of hibernation and reaction to critical stress stimuli. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 2011; 7 (4): 268-91.
17. Гусев Е.Ю., Юрченко Л.Н., Черешнев В.А., Зотова Н.В., Журавлева Ю.А., Зубова Т.Э. и др. Варианты развития острого системного воспаления. Цитокины и воспаление. 2008; 7 (2): 9-17.
18. Гусев Е.Ю., Зотова Н.В., Сипачев А.С. Травма и теория системного воспаления. *Вест. Анест. Реаним.* 2009; 6 (2): 2-10.
19. Гусев Е.Ю., Журавлёва Ю.А., Зотова Н.В., Соломатина Л.В., Зубова Т.Э., Бражников А.Ю. и др. Острое и хроническое системное воспаление: сравнительный анализ. Вестник Уральской медицинской академической науки. 2013; 2: 98-103.
20. Cavaillon J.-M., Annane D. Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. *J. Endotoxin Research*. 2006; 12 (3): 151-170.
21. Гусев Е.Ю., Юрченко Л.Н., Черешнев В.А., Зотова Н.В., Копалова Ю.А. Способ диагностики и прогноза системного воспаления с верификацией фаз и стадий. Патент на изобретение 2335771, РФ; 2006.
22. Гусев Е.Ю., Юрченко Л.Н., Черешнев В.А., Журавлева Ю.А., Соломатина Л.В. Хроническое системное воспаление как типовой патологический процесс. *Цитокины и воспаление*. 2008; 7 (4): 3-10.
23. Гусев Е.Ю., Черешнев В.А., Журавлева Ю.А., Соломатина Л.В., Зубова Т.Э. Варианты развития хронического системного воспаления. *Медицинская Иммунология*. 2009; 11 (2-3): 131-40.
24. Гусев Е.Ю., Соломатина Л.В., Паньшина Е.В., Журавлева Ю.А., Зубова Т.Э. Системное воспаление при хронической дисфункции трансплантированной почки. *Нефрология и диализ*. 2011; 13 (2): 82-8.
25. Гусев Е.Ю., Юрченко Л.Н., Мазуров В.Д., Дронищинец Н.Н. Информационные технологии в медицине — затишье перед бурей. *Век качества*. 2005; 6: 56-8.
26. Черешнев В.А., Гайнанов Д.Н., Аргучинская О.Н., Юрченко Л.Н., Поникаровских А.Э., Гусев Е.Ю. Способ построения единого информационного пространства для практического врача. Патент на изобретение 2299470, РФ; 2004.
27. Поровский Я.В. Тетенов Ф.Ф. Факторы воспаления и состояние микроциркуляторного русла у пациентов, подвергшихся воздействию малых доз ионизирующего излучения. *Вестн. новых мед. технологий*. 2012; 2: 358-61.

## References

1. Gusev E.Yu., Chereshnev V.A. Systemic inflammation: theoretical and methodological approaches to description of general pathological process model. Part 1. General characteristics of the process. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2012; 4: 3-14.
2. Gusev E.Yu., Chereshnev V.A. Systemic inflammation: theoretical and methodological approaches to description of general pathological process model. Part 2. Evolutionary aspects of. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2013; 1: 4-14.
3. Gusev E.Yu., Chereshnev V.A. Systemic inflammation: theoretical and methodological approaches to description of general pathological process model. Part 3. Prerequisites of non-syndromic approach. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2013; 3: 3-14.
4. Balk R.A. Severe sepsis and septic shock. Definitions, Epidemiology and Clinical Manifestations. *Crit. Care Clin.* 2000; 16 (2): 214-26.
5. Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B., Dellinger R.P., Fein A.M., Knaus W.A. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*. 1992; 101 (6): 1644-55.
6. Bone R.C. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARs. *Crit. Care Med.* 1996; 24 (7): 1125-8.
7. Meeran H., Messent M. The systemic inflammatory response syndrome. *Trauma*. 2001; 3: 89-100.
8. Vincent J.-L., Byl B. Defining a clinical syndrome of systemic inflammation. *Sepsis*. 2000; 4: 15-9.
9. Gusev E.Yu., Chereshnev V.A., Yurchenko L.N. Systemic inflammation as a typical pathological process. *Tsitokiny i vospalenie*. 2007; 6 (4): 9-21.
10. Gusev E.Yu., Zotova N.V. Sepsis and the theory of systemic inflammation. *Klinicheskaya anesteziologiya i reanimatologiya*. 2009; 6 (1): 20-7.
11. Chereshnev V.A., Gusev E.Yu., Zotova N.V. Fundamental-applied aspects of Systemic Inflammation in terms of Physiologic and Typical Pathological Process. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2010; 96 (7): 696-707.
12. Chereshnev V.A., Gusev E.Yu. Immunological and Pathophysiological mechanisms of Systemic Inflammation. *Meditsinskaya immunologiya*. 2012; 14 (1-2): 9-20.
13. Gusev E.Yu., Yurchenko L.N., Chereshnev V.A., Zotova N.V. Methodology of research in systemic inflammation. *Tsitokiny i vospalenie*. 2008; 7 (1): 15-23.
14. Oliver J. D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2010; 34 (4): 415-25.
15. Blicher, A., Wodzinska, K., Fidorra, M. Winterhalter M., Heimburg T. The Temperature Dependence of Lipid Membrane Permeability, Its Quantized Nature, and the Influence of Anesthetics. *Biophysical Journal*. 2009; 96 (11): 4581-91.
16. Sokolova T.N. The hypothesis of specific affinity of metabolic pathways inherent to onset of hibernation and reaction to critical stress stimuli. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 2011; 7 (4): 268-91.
17. Gusev E.Yu., Yurchenko L.N., Chereshnev V.A., Zotova N.V., Zhuravleva Yu.A., Zubova T.E. et al. The variants of acute systemic inflammation evolution. *Tsitokiny i vospalenie*. 2008; 7 (2): 9-17.
18. Gusev E.Yu., Zotova N.V., Sipachev A.S. Trauma and the theory of systemic inflammation. *Vest. Anest. Reanim.* 2009; 6 (2): 2-10.
19. Gusev E.Yu., Zhuravleva Yu.A., Zotova N.V., Solomatina L.V., Zubova T.E., Brazhnikov A.Yu. et al. Acute and chronic systemic inflammation: comparative analysis. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2013; 2: 98-103.
20. Cavallion J.-M., Annane D. Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. *J. Endotoxin Research*. 2006; 12 (3): 151-170.
21. Gusev E.Yu., Yurchenko L.N., Chereshnev V.A., Zotova N.V., Kopalova Yu.A. Method of diagnostics and prognosis of system inflammation with verification of phases and stages. Patent 2335771, RF; 2006.
22. Gusev E.Yu., Yurchenko L.N., Chereshnev V.A., Zhuravleva Yu.A., Solomatina L.V. Chronic systemic inflammation as typical pathological process. *Tsitokiny i vospalenie*. 2008; 7 (4): 3-10.
23. Gusev E.Yu., Chereshnev V.A., Zhuravleva Yu.A., Solomatina L.V., Zubova T.E. Progression variants of chronic systemic inflammation. *Meditsinskaya Immunologiya*. 2009; 11 (2-3): 131-40.
24. Gusev E.Yu., Solomatina L.V., Pan'shina E.V., Zhuravleva Yu.A., Zubova T.E. Systemic inflammation in chronic renal allograft dysfunction. *Nefrologiya i dializ*. 2011; 13 (2): 82-8.
25. Gusev E.Yu., Yurchenko L.N., Mazurov V.D., Dronishinets N.N. Information technologies in medicine — the calm before the storm. *Vek kachestva*. 2005; 6: 56-8.
26. Chereshnev V.A., Gaynanov D.N., Arguchinskaya O.N., Yurchenko L.N., Ponikarovskikh A.E., Gusev E.Yu. Method for bulding unified information space for practical doctor. Patent 2299470, RF; 2004.
27. Porovskiy Ya.V. Tetenev F.F. Evaluation of the impact of inflammatory factors on the microcirculatory bed in patients, exposed to low doses of ionizing radiation. *Vestn. novykh med. tekhnologiy*. 2012; 2: 358-61.

Поступила 20.11.14  
Received 20.11.14

## Сведения об авторах:

Черешнев Валерий Александрович — д.м.н., профессор, академик РАН, РАМН, директор ИИФ УрО РАН; verachernokova@mail.ru



© Коллектив авторов, 2014  
УДК: 616.092

Кожевникова Л.М., Меситов М.В., Павлова О.В., Московцев А.А.

## Агонисты 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов SCH 23390 и МК 212 увеличивают силу сокращения аорты крысы в присутствии вазопрессина или ангиотензина II

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,  
125315, Москва, ул. Балтийская, 8. E-mail: lubovmih@yandex.ru

Исследовано участие 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов в регуляции сократимости кровеносных сосудов. Установлено, что в аорте крысы и в культивируемых гладкомышечных клетках линии A7r5 экспрессируются 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы. Показано, что выраженный вазоконстрикторный эффект агонистов 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов SCH 23390 и МК 212 проявляется при их воздействии на сосуды после предварительной активации ангиотензиновых AT<sub>1A</sub>- и вазопрессиновых V<sub>1A</sub>-рецепторов. При активации 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов в 75% случаев наблюдается двухфазное сокращение — чередование фаз ритмичного сокращения и последующего расслабления колец аорты, а в 25% — тоническое. Вызванные агонистами SCH 23390 и МК 212 выраженные периодические высокоамплитудные сокращения фрагментов аорты сохраняются в течение длительного времени (более 1 ч). Выявлено, что центральную роль в механизмах трансдукции сигнала от 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов на ранних этапах играют кальмодулин и тирозиновая c-Src-киназа. Ингибиторы CaM трифторперазин и тирозиновой c-Src-киназы PP<sub>2</sub> отменяют вазоконстрикторную реакцию изолированных колец аорты крысы в ответ на воздействие агонистов 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов МК212 и SCH 23390, но не влияют на прирост силы сокращения, вызванный активатором G-белков фторалюминатом. Полученные данные позволяют предположить, что в сосудах 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы находятся в латентном состоянии («молчащие» рецепторы) и активация этих рецепторов зависит от функционального состояния рецепторов других эндогенных вазоконстрикторов.

**Ключевые слова:** серотонин, 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы, агонисты SCH 23390 и МК 212, экспрессия мРНК, вазоконстрикция, кальмодулин, тирозиновая c-Src-киназа

Kozhevnikova L.M., Mesitov M.V., Moskovtsev A.A.

## Agonists of 5HT<sub>2C</sub>-receptors SCH 23390 and MK 212 increase the force of rat aorta contraction in the presence of vasopressin and angiotensin II

FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8, Baltiiskaya str., 125315, Moscow, Russia. E-mail: lubovmih@yandex.ru

We investigated the role of 5HT<sub>2C</sub> receptors in regulation of blood vessel contractility. We determined expression of 5HT<sub>2C</sub> receptors in smooth muscle cell line A7r5 as well as on isolated rat aorta. It was shown that strong vasoconstriction effect of 5HT<sub>2C</sub> receptor agonists — SCH 23390 and MK 212 appeared on blood vessels after preliminary activation of angiotensin AT<sub>1A</sub>- and vasopressin V<sub>1A</sub>-receptors. Biphasic contraction (a rhythmic alternation of contraction and subsequent relaxation phases of aortic rings) and tonic contraction were observed in 75% and 25% of the cases after 5HT<sub>2C</sub> receptor activation, respectively. Periodic high amplitude constrictions of isolated rat aorta, induced by SCH 23390 and MK 212 agonists, were persisted for a long time (>1 hour). It was revealed that calmodulin and c-Src kinase play a central role in the mechanisms of signal transduction from 5HT<sub>2C</sub> receptors. Trifluoperazine and PP<sub>2</sub>, the inhibitors of calmodulin and c-Src kinase, respectively, abolished vasoconstriction reaction of isolated aortic rings in response to SCH 23390 and MK 212 but did not affect the strength gain of the vasoconstriction caused by fluoroaluminate, a G-protein activator. Taken together, these data suggest that 5HT<sub>2C</sub> receptors are in a latent state in blood vessels («silent» receptors) and activation of these receptors is dependent on the functional state of the receptors of other endogenous vasoconstrictors.

**Key words:** serotonin, 5HT<sub>2C</sub> receptors, SCH 23390 and MK 212 agonists, mRNA expression, vasoconstriction, calmodulin, c-Src kinase

Для корреспонденции: Кожевникова Любовь Михайловна — д.м.н., зав. лаб. патологии клеточной рецепции ФГБНУ «НИИОПП», e-mail: lubovmih@yandex.ru

Дисфункция серотонинергической системы вносит существенный вклад в этиологию и патогенез не только многочисленных психоневрологических, но и сердечно-сосудистых заболеваний, включая мигрень [1], гипертензию легочных артерий [2—5], атероск-

лероз [6]. Все это делает 5HT-рецепторы объектом пристального изучения и мишенью для лекарственных препаратов. По мере накопления данных об участии серотонина в регуляции сердечно-сосудистой системы становится очевидным, насколько сложным, порой противоположно направленным может быть эффект от воздействия серотонина (5HT) на организм. Открытие 5HT в сыворотке крови было связано с поиском гуморальных факторов, вызывающих развитие артериальной гипертензии [7]. В течение многих десятилетий 5HT рассматривали как вазоактивное соединение, которое негативно влияет на сердечно-сосудистую систему путем повышения тонуса артериальных сосудов и активации митогенеза в гладкомышечных клетках сосудов [8—11]. Оба этих процесса — усиление сокращения и рост сосудов, в конечном итоге должны приводить к стойкому повышению АД и развитию гипертонической болезни. Данное представление было подтверждено в многочисленных экспериментальных исследованиях на изолированных сосудах. Было продемонстрировано, что воздействие 5HT на изолированные фрагменты артерий приводит к их выраженному сокращению. Кроме того, у больных гипертонией и у гипертонических животных наблюдается повышенная чувствительность к действию 5HT, которая проявляется в значительном повышении артериального давления [12—14]. Наряду с этим, внутривенное введение 5HT здоровым добровольцам и животным приводит к уменьшению сосудистого сопротивления и снижению артериального давления [15—18]. Предполагают, что этот эффект связан главным образом со стимуляцией 5HT-рецепторов, локализованных в центральной нервной системе [19—21]. Ранее мы показали, что при травматическом шоке, а также при длительном применении глюкокортикоидных гормонов, наблюдается инверсия реакции на воздействие 5HT: увеличение АД в ответ на внутривенное введение амина в дозах, которые в физиологических условиях, напротив, приводили к его снижению [22, 23]. В литературе данный феномен был описан и при других патологических состояниях, в том числе при шоке и кровопотере [18, 24, 25]. Пока нет четкого представления о том, какие 5HT-рецепторы, сигнальные каскады, внутриклеточные белки и процессы, происходящие непосредственно на уровне сосудистой стенки, ответственны за кардинальное изменение реакции на введение 5HT в условиях нормы и патологии.

Убедительные данные о наличии в гладкомышечных клетках сосудов локальной серотонинергической системы, обеспечивающей синтез и межклеточный транспорт биогенного амина, были представлены в работе Ni и соавт. [26]. Необходимые компоненты для синтеза 5HT имеются и в эндотелиальных клет-

ках [27]. Авторами была высказана гипотеза, согласно которой концентрация 5HT в гладкомышечных и эндотелиальных клетках артерий может увеличиваться за счет внутриклеточного синтеза амина, и есть основания полагать, что активация локальной серотонинергической системы вносит существенный вклад в патогенез сердечно-сосудистых заболеваний, и прежде всего, артериальной гипертензии, атеросклероза и инсульта [26, 27]. Это открытие имеет принципиальное значение, поскольку одним из предметов для многочисленных дискуссий о роли 5HT в развитии гипертонических состояний было отсутствие корреляционной связи между уровнем свободно циркулирующего и связанного с тромбоцитами 5HT, с одной стороны, и развитием гипертонии, с другой [17, 18]. Различные ответы на действие 5HT обусловлены наличием 7 типов и более 15 видов 5HT-рецепторов, локализованных в различных тканях, в том числе в гладкомышечных и эндотелиальных клетках кровеносных сосудов [18, 28]. Традиционно считается, что основными вазоконстрикторными 5HT-рецепторами являются рецепторы 5HT<sub>2A</sub>-типа. Однако убедительных данных о причастности 5HT<sub>2A</sub>-рецепторов к развитию артериальной гипертензии до сих пор нет. Антигипертонический эффект блокатора этих рецепторов кетансерина связывают главным образом со способностью препарата ингибировать  $\alpha$ -адренорецепторы [29, 30]. Ранее мы показали, что в аорте и брыжеечной артерии крысы находятся «тихие» вазоконстрикторные 5HT<sub>1A</sub>-рецепторы, агонист-индуцированная активация которых зависит от функционального состояния рецепторов других эндогенных вазоконстрикторов [31, 32]. Нами была высказана гипотеза, согласно которой, в сосудах помимо 5HT<sub>1A</sub>-рецепторов в неактивном латентном состоянии могут находиться и другие типы 5HT-рецепторов, свойства которых могут значительно меняться в зависимости от условий и факторов, воздействующих на клетку. *Цель исследования* — идентификация 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов в аорте крысы и в гладкомышечных клетках линии A7r5 и изучение их роли в регуляции сократимости сосудов.

### Методика

Работа выполнена на изолированных фрагментах аорты крыс-самцов породы Вистар массой 200—220 г и на культуре гладкомышечных клеток (ГМК) линии A5r7, полученной из АТСС (США). Крыс, наркотизированных 25%-ным раствором уретана (4 мл/кг), декапитировали, извлекали грудной отдел аорты и брыжеечную артерию и помещали в охлажденный физиологический раствор Krebs—Хенселейта. Сосуды очищали от жировой и соединительной ткани. Кольцевые фрагменты сосудов

шириной 1,5—2 мм крепили на держателях, погруженных в термостатируемые камеры с физиологическим раствором (37°C), через который пропускали карбоген (смесь O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> = 95/5%). Измерение силы сокращения изолированных фрагментов сосудов проводили в изометрическом режиме по методу Мульвани согласно ранее описанному протоколу [15]. Для оценки функциональной активности рецепторов в работе применены фармакологические подходы. О функциональном состоянии ГМК и целостности эндотелиального слоя сосудов судили по силе сокращения изолированных колец сосудов в ответ на воздействие агониста α<sub>1</sub>-адренорецепторов (α<sub>1</sub>-АР) норадреналина (NA, Sigma, США) и степени их расслабления на действие агониста мускариновых рецепторов карбахола (Sigma). Были использованы серотонин (5HT), агонисты 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов — SCH 23390 hydrochloride и МК 212 (Tocris, США), а также агонисты 5HT<sub>2A</sub>-рецепторов — DOI hydrochloride (DOI, Sigma, США) и ТВС-2 (Tocris). Применяли агонисты ангиотензиновых (AT<sub>1A</sub>) и вазопрессиновых (V<sub>1A</sub>) рецепторов соответственно ангиотензин II (AT<sub>1II</sub>) и аргинин-вазопрессин (AVP) (Sigma). Оценивали влияние антагонистов 5HT-рецепторов кетансерина (5HT<sub>2A</sub>/5HT<sub>2C</sub>, Alexis, США), SB 221284 (5HT<sub>2C</sub>/5HT<sub>2B</sub>, Tocris) и NAN-190 hydrobromide (5HT<sub>1A</sub>, Sigma), а также антагониста α<sub>1</sub>-АР празозина (Sigma) на агонист-индуцированное сокращение изолированных фрагментов сосудов. Изучали влияние ингибиторов кальмодулина, с-Src- и Rho-киназ соответственно трифторперазина (TFP, Tocris), 3-(4-chlorophenyl) 1-(1,1-dimethylethyl)-1H-pyrazolo [3,4-d]pyrimidin-4-amine (PP<sub>2</sub>, Tocris) и фасудила (Sigma) на 5HT-индуцированное сокращение колец аорты. Время инкубации изолированных фрагментов аорты крысы с ингибиторами и антагонистами 5HT-рецепторов составляло 20 мин, после чего оценивали характер изменения сократительного ответа на воздействие вазоактивных соединений.

ГМК линии A577 выращивали с использованием модифицированной среды Игла DMEM с глюкозой (4,5 г/л) («GIBCO», США), с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS), 10 мкг/мл гентамицина и 2 ммоль/л глутамина, при 37°C, в атмосфере с добавлением 5% CO<sub>2</sub>. Жизнеспособность клеток оценивали методом исключения витального красителя трипанового синего на автоматическом счётчике клеток Countess™ («Invitrogen», США).

Выделение суммарной клеточной РНК из клеток линии A7r5 и ткани сосуда проводили с использованием набора RNeasy® Mini Kit («Qiagen GmbH», Хильден, Германия) в соответствии с протоколом про-

изводителя. Лизис клеток адгерентной линии A7r5 проводили непосредственно в культуральной посуде добавлением 350 мкл лизирующего буфера RLT, содержащего 0,1% β-меркаптоэтанола. Для выделения суммарной клеточной РНК из аорты крысы сосуд предварительно растирали пестиком в присутствии жидкого азота. Гомогенизат переносили в 1,5 мл пробирки и лизировали в 350 мкл буфера RLT, содержащего 0,1% β-меркаптоэтанола. Для полной гомогенизации лизат пропускали через шприц с иглой 20g. Дальнейшие этапы выделения суммарной РНК из клеток A7r5 и ткани сосуда были одинаковыми. Концентрацию РНК и примесей в образцах определяли на спектрофотометре NanoDrop® ND-1000 («Thermo Fisher Scientific Inc.», США). В дальнейшую пробоподготовку брали образцы суммарной РНК с отношением показателей абсорбции при длинах волн 260/280 нм не ниже 2,0 и отношением 260/230 нм — не ниже 2,2. Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили с использованием гексануклеотидных праймеров, последовательности которых представляли собой все возможные комбинации из шести нуклеотидов, и обратной транскриптазы M-MuLV в составе набора RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit («Fermentas», Литва) в соответствии с протоколом производителя.

Для амплификации полученных в ходе реакции ОТ фрагментов комплементарной ДНК исследуемых генов и детектирования в режиме реального времени продуктов ПЦР (ПЦР-РВ) использовали специфические праймеры и универсальный набор реактивов Maxima™ SYBRGreen/ROX qPCR MasterMix («Fermentas», Литва). Конечная концентрация каждого праймера составляла 0,3 мкмоль/л. Реакцию проводили на амплификаторе CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) по следующему трехэтапному температурно-временному протоколу:

- 1) начальная денатурация — 95°C, 10 мин;
- 2) термоциклирование (40 циклов) с шагами денатурация — 95°C, 15 с., отжиг — 56°C, 30 с, элонгация — 72°C, 30 с;
- 3) заключительный синтез — 72°C, 5 мин.

Регистрация интенсивности флуоресценции SybrGreen, связывающегося с двухцепочечной ДНК, и пассивного референсного красителя ROX осуществлялась автоматически программным обеспечением прибора в конце стадии элонгации каждого цикла. Для подтверждения специфичности реакции после этапа заключительного синтеза регистрировали изменение флуоресценции при плавлении продуктов амплификации в пробах в диапазоне температур от 55°C до 95°C с шагом 0,5°C и продолжительностью шага 10 с (кривая плавления). В каждую экспериментальную поста-

новку включали контрольные реакции: отрицательный контроль без матрицы — без кДНК; отрицательный контроль с неспецифической матрицей — суммарной РНК; положительный контроль, содержащий кДНК гена  $\beta$ -Actin. Использовались праймеры со следующими последовательностями:

- для 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов —  
5'-TTCGTTCTCATCGGGTCSCTT-3' (прямой) и  
5'-CACATAGCCAAATCCACASAA-3' (обратный);
- для  $\beta$ -Actin —  
5'-CCTSTATGCCAACACAGTGC-3' (прямой) и  
5'-GCTCAGTAACAGTCCGCCTA-3' (обратный).

Для подтверждения специфичности ПЦР-РВ проводили разделение продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза в 1,7% агарозном геле. Гели фотографировали на станции гель-до-

кументирования Kodak Image Station 440CF («Eastman Kodak Company», США). Статистическая обработка данных проводилась в программе Statistica 6.0. При оценке данных использовали t-критерий Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

Ранее нами были получены данные об отсутствии влияния агониста 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов SCH 23390 на тонус «интактных» сосудов крысы, на основе которых было высказано предположение о том, что 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы не участвуют в регуляции тонуса кровеносных сосудов [33]. В настоящем исследовании также были получены данные о том, что в ответ на воздействие на изолированные кольца аорты кры-

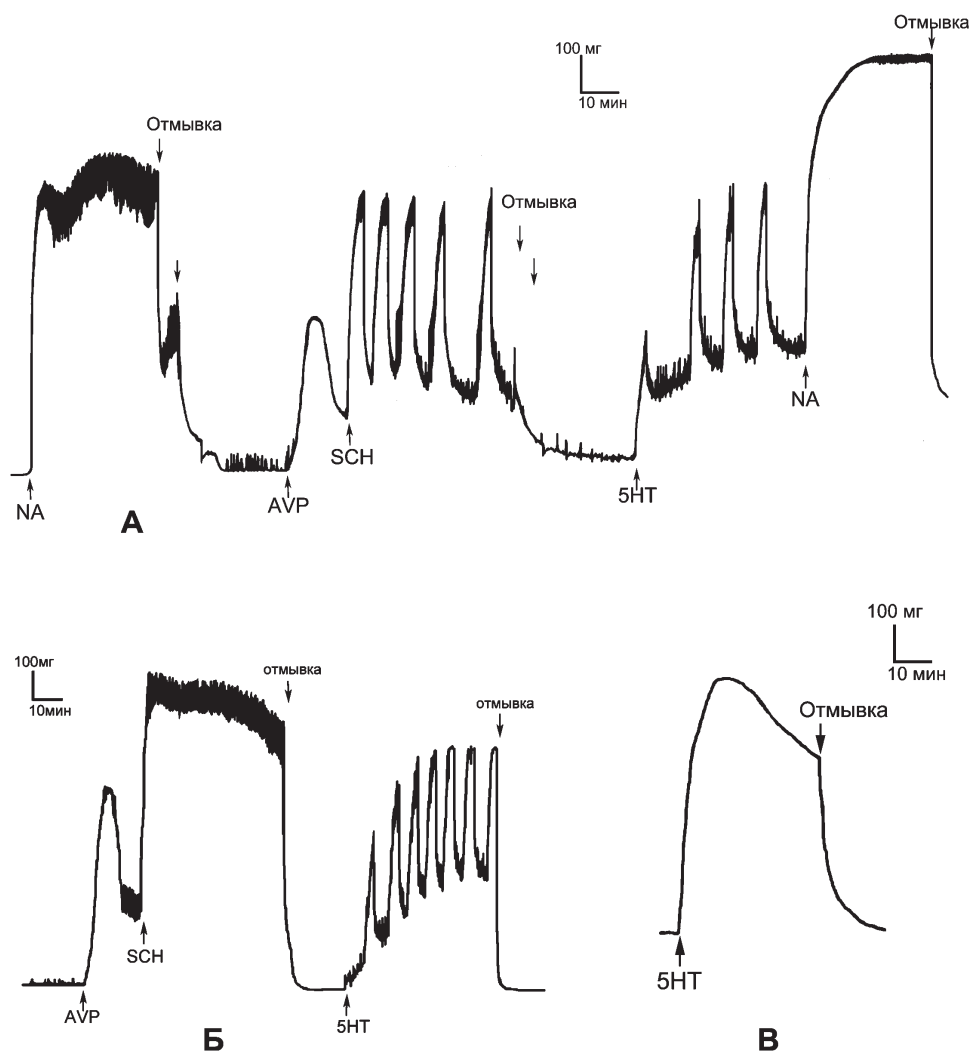


Рис. 1. Периодические высокоамплитудные (А) и тонические (Б) сокращения изолированных колец аорты, вызванные воздействием агониста 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов SCH 23390 на предсокращенные аргинин-вазопрессином (AVP) сосуды. Кинетика 5HT-индуцированного сокращения сосудов до (В) и после (А, Б) активации 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов.

сы агониста 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов SCH 23390 в концентрациях  $10^{-8}$  —  $10^{-5}$  М сила их сокращения не изменяется. Выраженный вазоконстрикторный эффект агониста SCH 23390 проявляется только при его воздействии на предварительно сокращенные АП II ( $10^{-8}$  М) или AVP ( $10^{-8}$  М) кольца аорты. Под воздействием SCH 23390 сила сокращения колец аорты возрастала на  $650 \pm 21$  мг ( $n = 28$ ). Активация 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов в 75% случаев ( $n = 21$ ) индуцировало выраженные периодические высокоамплитудные сокращения фрагментов аорты (рис. 1,А), а в 25% ( $n = 7$ ) — тоническое сокращение (рис. 1,Б). Вызванное агонистом SCH 23390 ритмическое и тоническое сокращение сосудов сохранялось в течение длительного времени (более 1 ч). Описанная кинетика сокращения сосудов в ответ на воздействие SCH 23390 была характерна для сосудов, предсокращенных как AVP, так и АП II.

Неожиданными оказались результаты об изменении кинетики сокращения на 5HT при его воздействии на сосуды, отмытые от агонистов 5HT<sub>2C</sub>- и АП IА- или V1А-рецепторов (рис. 1). В норме кривая 5HT-индуцированного сокращения колец аорты имеет куполообразную форму — вслед за подъемом следует относительно медленный спуск, который соответствует снижению силы сокращения сосудов (рис. 1,В). Как показано на рис. 1, добавление 5HT через 1 час с момента активации 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов в подавляющем большинстве случаев приводило к не свойственному для данного амина двухфазному сокращению колец аорты.

В отличие от SCH 23390 воздействие на «интактные» сосуды агониста 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов МК 212

( $5 \times 10^{-6}$  М) в 30% случаев ( $n = 9$ ) приводило к увеличению силы сокращения на  $472 \pm 27$  мг. Выраженный вазоконстрикторный эффект агониста в 100% случаев воспроизводился при его воздействии на предварительно сокращенные АП II или AVP фрагменты аорты ( $n = 16$ ). Кинетика МК 212-индуцированного сокращения колец аорты характеризовалась чередованием фаз ритмического сокращения и последующего расслабления (рис. 2А). Добавление к сокращающимся сосудам агониста 5HT<sub>2A</sub>-рецепторов ТВС-2 ( $5 \times 10^{-7}$  М) или DOI ( $10^{-6}$  М) увеличивало частоту и продолжительность высокоамплитудных сокращений (рис. 2,Б). 5HT<sub>2</sub>-рецепторы структурно высокоомологичны, что обуславливает значительное сходство в их фармакологии. Известно, что агонист МК 212 обладает высокой селективностью по отношению к рецепторам 5HT<sub>2C</sub>-типа и незначительной — к 5-HT<sub>2A</sub>-типа. Возможно, редко воспроизводимые случаи индуцированного МК 212 сокращения «интактных» сосудов обусловлены возможностью данного агониста связываться с 5HT<sub>2A</sub>-рецепторами.

Агонист 5HT<sub>2</sub>-рецепторов DOI обладает высокой селективностью по отношению к рецепторам 5HT<sub>2A</sub>-типа, однако его часто используют в экспериментах на культуре клеток, экспрессирующих 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы человека, для изучения механизмов клеточной сигнализации от данного типа рецепторов [34]. Поэтому не исключено, что эффект, полученный от воздействия ТВС-2 или DOI на фоне активации 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов, мог быть обусловлен их способностью взаимодействовать с данными рецепторами.

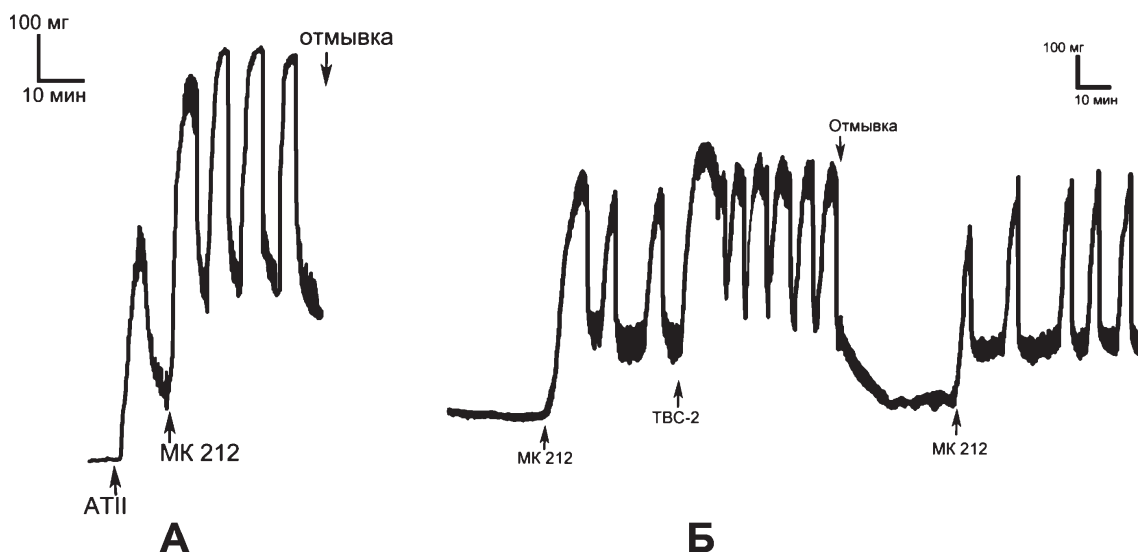


Рис. 2. Двухфазное сокращение изолированных колец аорты (А) в ответ на воздействие агониста 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов МК 212 на предсокращенные ангиотензином II (АТ II) сосуды. Б — кинетика сокращения колец аорты, вызванная последовательным воздействием на сосуды агонистов 5HT<sub>2C</sub>- и 5HT<sub>2A</sub>-рецепторов соответственно МК 212 и ТВС-2.

Методом ингибиторного анализа мы попытались получить дополнительное подтверждение тому, что полученный вазоконстрикторный эффект от воздействия на сосуды агонистов SCH 23390 и МК 212 вызван передачей сигнала от 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов. Известно, что на внутриклеточных фрагментах 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов, как и на 5HT<sub>2A</sub>- и 5HT<sub>1A</sub>-рецепторах, имеются участки прямого взаимодействия с кальмодулином (CaM) [35—38]. Ранее было установлено, что ингибиторы CaM избирательно подавляли вазоконстрикторную реакцию в ответ на воздействие 5HT и агонистов 5HT<sub>2A</sub>- и 5HT<sub>1A</sub>-рецепторов [39]. Исследования показали, что в присутствии ингибитора CaM TFP ( $2 \times 10^{-5}$  М) полностью подавляется вазоконстрикторная реакция изолированных колец аорты крысы на воздействие SCH 23390 и МК 212 при их добавлении к предсокращенным AVR или АПВ сосудам (таблица). В то же время ингибитор CaM не оказывал негативного влияния на вазоконстрикцию, вызванную активатором G-белков фторалюминатом (10 мМ NaF в присутствии 20 мкМ AlCl<sub>3</sub>). Как в отсутствие, так и в присутствии TFP в ответ на воздействие фторалюмината сила сокращения колец аорты увеличивалась соответственно на  $743 \pm 31$  мг и  $781 \pm 37$  мг.

Изучение влияния ингибитора тирозиновой c-Src-киназы PP<sub>2</sub> ( $10^{-5}$  М) на сократительные свойства сосудов показало, что препарат полностью подавляет вазоконстрикторную реакцию, вызванную действием 5HT и агонистов 5HT<sub>2</sub>- и 5HT<sub>1A</sub>-рецепторов (таблица). В контрольных экспериментах применяли неактивный аналог PP<sub>3</sub> ( $10^{-5}$  М). В присутствии ингибитора PP<sub>2</sub> не изменялась реакция колец аорты на воздействие NA ( $10^{-7}$  М) и активатора G-белков фторалюмината.

Установлено, что как в присутствии, так и в отсутствие ингибитора Rho-киназы фасудила (ФАС,  $2 \times 10^{-5}$  М) индуцированный агонистами 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов SCH 23390 и МК 212 прирост силы сокращения колец аорты оставался неизменным. Отмечено, что в присутствии ФАС в ряде случаев уменьшалась продолжительность фазы тонического сокращения в ответ на действие агонистов 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов. ФАС не оказывал негативного влияния на 5HT-индуцированную вазоконстрикцию аорты крысы (таблица). В отличие от этого, инкубация сосудов с ингибитором Rho-киназы подавляла сократительную реакцию колец аорты на воздействие агонистов 5HT<sub>2A</sub>- и 5HT<sub>1A</sub>-рецепторов соответственно на 70—85% и 90% (таблица). Полученные данные позволяют предположить, что в присутствии ФАС сокращение сосудов, вызванное воздействием 5HT, реализуется посредством 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов по механизму независимо от активности Rho-киназы.

Как следует из представленных в таблице данных, антагонист 5HT<sub>2C</sub>/5HT<sub>2B</sub>-рецепторов SB 221284 ( $10^{-5}$  М) подавляет вазоконстрикцию, вызванную воздействием на сосуды 5HT и агонистов 5HT<sub>2A</sub>/2C-рецепторов. О специфичности действия SB 221284 по отношению к вазоконстрикторному эффекту 5HT свидетельствуют данные об отсутствии ингибирования NA-индуцированного сокращения. Антагонисты 5HT<sub>1A</sub>- и  $\alpha_1$ -АР соответственно NAN-190 ( $10^{-6}$  М) и празозин ( $10^{-7}$  М) не ингибируют вазоконстрикторное действие агонистов 5HT<sub>2A</sub>/2C-рецепторов и 5HT. Результаты, полученные на аорте крысы, были воспроизведены в экспериментах на изолированных фрагментах брыжеечной артерии (данные не приводятся). Таким образом,

Таблица

Влияние ингибиторов CaM, Rho- и c-Src-киназ и антагонистов 5HT- и  $\alpha$ -адренорецепторов на агонист-индуцированное сокращение изолированных колец аорты крысы

| Ингибиторы и антагонисты              | Агонисты |                             |                            |                             |                                |                               |                  |
|---------------------------------------|----------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------|
|                                       | 5HT      | DOI<br>5HT <sub>2A/2C</sub> | TBC-2<br>5HT <sub>2A</sub> | SCH<br>5HT <sub>2C/1A</sub> | МК 212<br>5HT <sub>2C/2A</sub> | 8-OHDPAT<br>5HT <sub>1A</sub> | NA $\alpha$ -AR  |
| TFP ингибитор CaM                     | (-)      | (-)                         | (-)                        | (-)                         | (-)                            | (-)                           | (-)              |
| PP <sub>2</sub> ингибитор cSrc-киназы | (-)      | (-)                         | (-)                        | (-)                         | (-)                            | (-)                           | 0                |
| ФАС ингибитор Rho-киназы              | 0        | Подавляет на 85%            | подавляет на 70 %          | 0                           | 0                              | Подавляет на 90%              | Уменьшает на 40% |
| SB 221284 (5HT <sub>2C/2B</sub> )     | (-)      | (-)                         | (-)                        | (-)                         | (-)                            | 0                             | 0                |
| NAN-190 5HT <sub>1A</sub>             | 0        | 0                           | 0                          | 0                           | 0                              | (-)                           | (-)              |
| Празозин $\alpha$ -AR                 | 0        | 0                           | 0                          | 0                           | 0                              | Уменьшает на 30%              | (-)              |

Примечание. 0 — достоверно не изменяет; (-) — 100%-ое подавление агонист-индуцированного вазоконстрикторного ответа

методом фармакологического анализа были получены данные, которые позволили предположить, что в аорте и брыжеечной артерии крыс локализованы 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы, посредством которых реализуется вазоконстрикторный эффект 5HT.

Методом ОТ-ПЦР-РВ установлено, что в аорте крысы и в культуре ГМК линии А7г5 экспрессируется мРНК 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов. Однако уровень мРНК 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов как в аорте, так и в клетках линии А7г5 был низким. Для контроля возможности образования ПЦР-продукта за счет контаминации геномной ДНК мы использовали дополнительно образцы кДНК, синтезированной на основе тотальной РНК, выделенной из аорты крыс с травматическим шоком, который моделировали по ранее описанному методу [15]. Как показано на рис. 3,А, уровень мРНК 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов в аорте контрольных крыс в 5 раз выше по сравнению с уровнем мРНК в аорте, выделенной через 24 часа после нанесения животным механической травмы на мягкие ткани бедра. Полученные данные являются косвенным подтверждением того, что определяемый уровень мРНК специфичен по отношению к 5HT<sub>2C</sub>-рецепторам. О специфичности ПЦР-РВ свидетельствовали и данные разделение продуктов амплификации методом электрофореза в 1,7% агарозном геле (рис. 3,Б).

### Заключение

В настоящее время идентифицированы три подтипа 5HT<sub>2</sub>-рецепторов — 5HT<sub>2A</sub>, 5HT<sub>2B</sub> и 5HT<sub>2C</sub>. Фармакологические профили 5HT<sub>2</sub>-рецепторов очень похожи, что представляет определенные сложности в определении их функциональной роли [27, 40, 41]. 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы широко представлены в различных структурах мозга и являются потенциальной мишенью различных фармакологических препаратов, применяемых для лечения депрессии, шизофрении, тревожности и других заболеваний центральной нервной системы [42—45]. Исключительно высок уровень экспрессии этих рецепторов в сосудисто-эпителиальных сплетениях мозга. Вопрос о наличии 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов в сосудах и их участии в регуляции сократимости до сих пор остается открытым. Уникальной особенностью 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов, которая отличает эти рецепторы не только от многочисленных типов 5HT-рецепторов, но и других видов сопряженных с G-белками рецепторов, является посттранскрипционное РНК-редактирование [37]. Редактирование мРНК 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов приводит к изменению аминокислотной последовательности во второй внутриклеточной петле рецепторной молекулы и образованию более 20 изоформ рецептора. Полагают, что редактирование РНК представляет собой но-

вый механизм регуляции 5HT<sub>2C</sub>-опосредованной внутриклеточной сигнализации. В результате РНК-редактирования может в 10—15 раз снижаться эффективность взаимодействия рецепторной молекулы с G-белками [46—48], изменяться не только лиганд-зависимая, но и лиганд-независимая сигнализация [49]. Геномная (неотредактированная) форма 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов IN1 обладает постоянной базальной активностью по отношению к G<sub>q</sub>-зависимой сигнализации [49—51]. Опосредовано через G $\alpha$ q-субъединицу 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы активируют фосфолипазу C (PLC) [52]. В результате 5HT<sub>2C</sub>-индуциро-

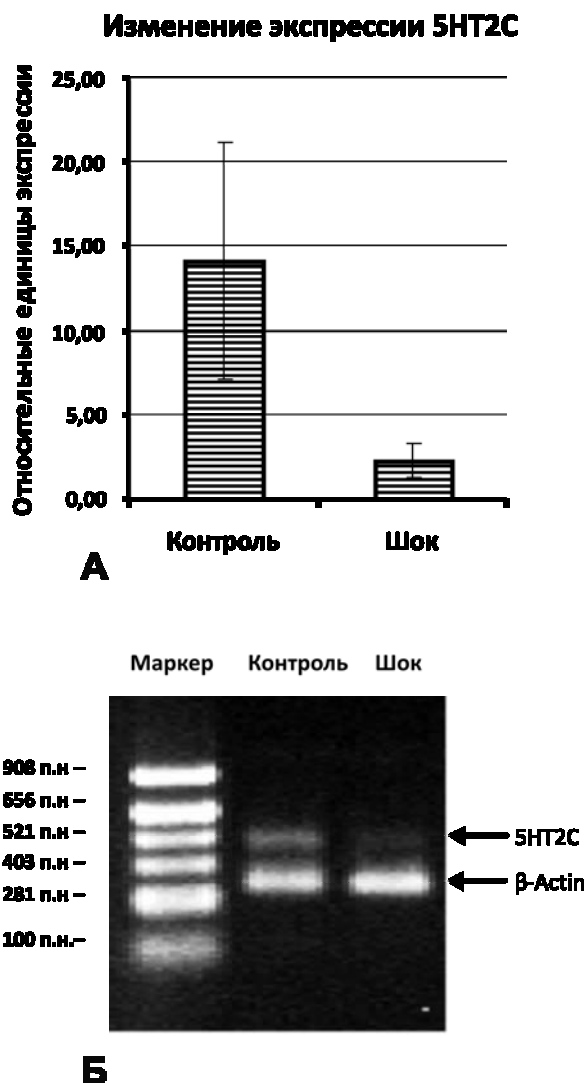


Рис. 3. Экспрессия мРНК 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов в аорте контрольных крыс и крыс с травматическим шоком:

А — уровень экспрессии мРНК 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов (5HT<sub>2C</sub>) в аорте контрольных крыс значительно выше, чем в аорте крыс, выделенных через 24 часа после нанесения травмы (P < 0,05); Б — ПЦР-амплифицированные продукты 5HT<sub>2C</sub> и  $\beta$ -actin, разделенные в 1,7% агарозном геле.

ванного гидролиза фосфоинозитола образуется инозитолтрифосфат ( $IP_3$ ), активируются  $IP_3$ -рецепторы эндоплазматического ретикулаума, что приводит к увеличению концентрации ионов  $Ca$  в цитоплазме клеток (рис. 4А). В экспериментах на культуре клеток линии СРЕ (choroid plexus epithelial) было показано, что 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы (INI) активируют малый G-белок RhoA, и этот процесс опосредован  $G_{\alpha_{13}}$  субъединицей гетеротримерного комплекса G-белков (рис. 4Б) [53]. Аналогичные результаты были получены и на линии клеток NIH-3T3, экспрессирующих INI изоформу 5HT<sub>2C</sub>-рецептора человека [34].

Первые данные об экспрессии 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов в аорте и легочной артерии крыс с легочной гипертензией были представлены в работе Zhang и соавт. [5]. В результате проведенных исследований нами также было установлено, что в аорте крысы и в ГМК линии A7r5 экспрессируются 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы. Однако уровень мРНК рецепторов 5HT<sub>2C</sub>-типа в аорте крысы значительно ниже по сравнению с мРНК рецепторов 5HT<sub>2A</sub>-типа [54].

В настоящем исследовании было установлено, что 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы в физиологических условиях находятся в латентном состоянии, и их активность может проявляться на фоне активации рецепторов других вазоактивных соединений. Отличительной особенностью кинетики 5HT<sub>2C</sub>-индуцированного сокращения является фазовый характер — ритмическое чередование сокращения и релаксации (рис. 1). Характерно, что после лиганд-индуцированной активации 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов изменяется кинетика сократительного ответа и на воздействие 5HT и агонистов 5HT<sub>2A</sub>-рецепторов TBC-2 и DOI — как и в случае с применением антагонистов 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов эти соединения вызывали ритмические сокращения изо-

лированных колец аорты (рис. 1). Этот эффект был специфичен по отношению к вазоконстрикторным 5HT-рецепторам, поскольку добавление к ритмично сокращающимся сосудам приводило к увеличению силы сокращения сосудов и в большинстве случаев отменяло двухфазный характер сокращения. Ранее нами была описана аналогичная кинетика двухфазного сокращения изолированных колец аорты и брыжеечной артерии в ответ на воздействие агониста 5HT<sub>1A</sub>-рецепторов 8-ОН-ДРАТ [32]. По-видимому, высокоамплитудные колебания силы сосудистого сокращения вызваны периодическими изменениями электрического потенциала плазматической мембраны ГМК сосудов. Показано, что воздействие агонистов на экспрессированные в ооцитах Xenopus 5HT<sub>1A</sub>-рецепторы человека вызывало активацию плавного входящего тока,  $Ca$ -чувствительных хлорных каналов и калиевых G-белок-зависимых каналов обратного выпрямления [55].

Исследования на кольцах коронарных артерий человека, выделенных от пациентов с идиопатической дилатационной кардиомиопатией, показали, что ответ на воздействие 5HT в 60% случаев наблюдается двухфазное сокращение артерий и только в 40% — тоническое [56]. Авторы приводят убедительные данные о том, что за фазу релаксации в цикле ритмичных сокращений коронарной артерии ответственны MaxiK каналы (voltage-dependent and  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel). Так, блокатор MaxiK каналов ибериотоксин нивелировал ритмичность сокращений [56]. Можно предположить, что в ГМК сосудов посредством 5HT<sub>1A</sub>- и 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов реализуются перечисленные механизмы активации ионных каналов. В этом случае происходит деполяризация плазматической мембраны этих клеток, что в итоге приводит к открыванию потенциалуправляемых каль-

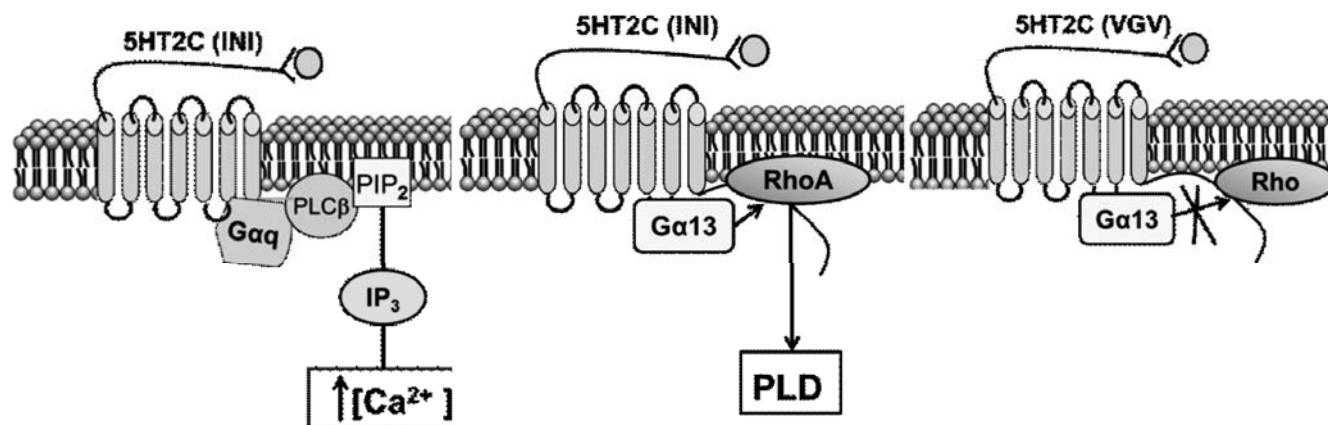


Рис. 4. Влияние редактирования мРНК 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов на трансдукцию сигнала:

А, Б — геномная форма 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов (INI) активирует  $G_{\alpha q}$ - и  $G_{\alpha_{13}}$ -опосредованный сигнальный каскад; В — отредактированная изоформа 5HT<sub>2C</sub>-рецептора (VGV) утрачивает  $G_{\alpha_{13}}$ -опосредованный механизм активации Rho-белка и зависимый от него сигнальный каскад.



циевых каналов и сокращению сосудов. Потенциалуправляемые кальциевые каналы быстро инактивируются, в результате чего сосуд расслабляется. Повторная деполяризация мембраны вновь их активизирует и наступает следующее сокращение и таким образом, возможно, происходит ритмичное сокращение сосуда под действием агонистов 5HT<sub>1A</sub>- и 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов. Сложнее ответить на вопрос о природе 5HT<sub>2C</sub>-индуцированных изменений кинетики сокращения сосудов в ответ на воздействие 5HT и агонистов 5HT<sub>2A</sub>-рецепторов. Исследования в этом направлении будут продолжены.

На i2 домене и C-терминальном конце 5HT-рецепторов имеются участки прямого взаимодействия с CaM [37]. Ранее было показано, что ингибиторы CaM подавляют 5HT-индуцированный кальциевый сигнал в ГМК аорты крысы и клетках линии A7r5 и вазоконстрикторную реакцию в ответ на воздействие агонистов 5HT<sub>2A</sub>- и 5HT<sub>1A</sub>-рецепторов [57]. В настоящем исследовании мы получили аналогичные данные, свидетельствующие о важной роли CaM в передаче сигнала от 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов. Поскольку ингибитор CaM трифторперазин не оказывал негативного влияния на силу сокращения изолированных колец аорты крысы при воздействии на них активатора G-белков фторалюмината, мы полагаем, что CaM оказывает непосредственное влияние на конформацию рецепторной молекулы и связь с гетеротримерным комплексом G-белков. Хотя нельзя исключить участие CaM в G-белок-независимых механизмах внутриклеточной сигнализации. Имеются доказательства того, что i2 домен регулирует взаимодействие рецепторной молекулы не только с комплексом G-белков, но и с другими сигнальными молекулами, в том числе с  $\beta$ -аррестином [58-60]. Показано, что связывание CaM с C-терминальным доменом 5-HT<sub>2C</sub>-рецептора стабилизирует взаимодействие рецептора с  $\beta$ -аррестином и стимулирует активацию  $\beta$ -аррестин-зависимой сигнализации по ERK1/2 пути [61, 62].

Мы показали, что ингибитор тирозиновой c-Src-киназы PP<sub>2</sub>, как и ингибитор CaM, полностью подавляет вазоконстрикторную реакцию в ответ на воздействие SCH 23390 и МК 212, что свидетельствует о важной роли тирозиновой c-Src-киназы в передаче внутриклеточного сигнала от 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов. Полученные результаты согласуются с данными литературы. В экспериментах на культивируемых нейронах было продемонстрировано, что 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы индуцируют активацию тирозиновой c-Src [63]. По мнению авторов, 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы модулируют NMDA-опосредованную деполяризацию мотонейронов по c-Src-киназ-зависимому механизму. Кроме того, известно, что c-Src является

важным фактором в  $\beta$ -аррестин-зависимой активации MAP-киназного сигнального каскада [62].

В настоящем исследовании было установлено, что в отличие от 5HT<sub>2A</sub>- и 5HT<sub>1A</sub>-рецепторов реализация вазоконстрикторного эффекта от 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов не зависит от активности Rho-киназы. В экспериментах на клетках линии NIH-3T3, экспрессирующие отредактированную изоформу 5HT<sub>2C</sub>-рецептора (VGV), показано, что воздействие агониста этих рецепторов не приводит к активации Rho-белка и PLD [34] (рис. 4С). С учетом данных литературы, можно предположить, что в ГМК кровеносных сосудов локализованы частично или полностью отредактированные изоформы 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов, не обладающие способностью G $\alpha_{13}$ -опосредованно активировать Rho-белок и зависимый от него сигнальный каскад.

Таким образом, в аорте и брыжеечной артерии крысы локализованы 5HT<sub>2C</sub>-рецепторы, которые в условиях нормы находятся в функционально неактивном состоянии. Уровень экспрессии 5HT<sub>2C</sub>-рецепторов в аорте крысы невысок, а механизм их активации напрямую зависит от функционального состояния рецепторов других эндогенных вазоконстрикторов. Вышеизложенные результаты, с учетом ранее полученных данных, позволяют предположить, что активация локализованных в кровеносных сосудах «молчащих» 5HT-рецепторов (5HT<sub>2C</sub>- и 5HT<sub>1A</sub>-типа) является одним из механизмов синергизма действия 5HT с другими вазоактивными соединениями. Этот феномен, по-видимому, имеет общебиологическое значение и вносит существенный вклад в сложные механизмы межрецепторного взаимодействия и развитие как защитных, так и патологических процессов.

### Список литературы

1. Buzzi M.G., Moskowitz M.A. The pathophysiology of migraine: year 2005. *J. Headache Pain.* 2005; 6: 105-11.
2. Eddahibi S., Adnot S. The serotonin pathway in pulmonary hypertension. *Arch. Mal. Coeur. Vaiss.* 2006; 99(6): 621-5.
3. MacLean M.R., Herve P., Eddahibi S., Adnot S. 5-Hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 2000; Vol. 131:161-8.
4. MacLean M.R., Dempsey Y. Serotonin and pulmonary hypertension from bench to bedside? // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2009; 9(3): 281-6.
5. Zhang B., Liu Yi., Luo Y., Niu W., Li Z.C. Alteration of Serotonin 2C Receptor Expression in the Aorta and the Pulmonary Artery in Rats Exposed to Hypoxia. *Chinese J. Physiol.* 2008; 51(6): 338-47.
6. Hara K., Hirowatari Y., Yoshika M., Komiyama Y., Tsuka Y., Takahashi H. The ratio of plasma to whole-blood

serotonin may be a novel marker of atherosclerotic cardiovascular disease. *J. Lab. Clin. Med.* 2004. Vol. 144: 31-7.

7. Rapport M.M., Green A.A., Page I.H. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* — 1948. — Vol. 176(3). — P. 1243-1251.

8. Nemecek G.M., Coughlin S.R., Handley D.A., Moskowitz M.A. Stimulation of aortic smooth muscle cell mitogenesis by serotonin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986; 83(3): 674-8.

9. Watts S.W., Fink G.D. 5-HT<sub>2B</sub>-receptor antagonist LY-272015 is antihypertensive in DOCA-salt-hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* 1999; Vol. 276. — H944 -H952.

10. Russell A., Baner A., Berlin H., Fink G.D., Watts S.W. 5-Hydroxytryptamine(2B) receptor function is enhanced in the N(omega)-nitro-Larginine hypertensive rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002; Vol. 303: 179 -87.

11. Watts S.W. 5-HT in systemic hypertension: foe, friend or fantasy? *Clin. Sci.* 2005; Vol. 108: 399-412.

12. Lebrech D. Portal hypertension: serotonin and pathogenesis. *Cardiovasc. Drugs. Ther.* 1990; Vol. 4(1): 33-5.

13. Zwieten, van P.A., Bruning T.A. Comparison of the hemodynamic effects of urapidil and flusinolan in healthy volunteers. *Blood Press. Suppl.* 1994; Vol. 4: 19-24.

14. Davis R.P., Pattison J., Thompson J.M. et al. 5-hydroxytryptamine (5-HT) reduces total peripheral resistance during chronic infusion: direct arterial mesenteric relaxation is not involved. *BMC Pharmacology.* 2012; 12: 4.

15. Кожевникова Л.М., Авдонин П.В. Нарушение гормональной регуляции сосудистого тонуса при травматическом шоке. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2006; 141(5): 511-4.

16. Zwieten, van P.A., Blauw G.J., van Brummelen P. Serotonergic receptors and drugs in hypertension. *Pharmacol. Toxicol.* 1992; 70(6): 17-22.

17. Diaz J., Ni W., Thompson J., King A., Fink G.D., Watts S.W. 5-Hydroxytryptamine lowers blood pressure in normotensive and hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008; Vol. 325: 1031-8.

18. Watts S.W., Morrison S.F., Davis R.P., Barman S.M. Serotonin and blood pressure regulation. 2012; 64(2): 359-88.

19. Huguet F., Brisac A.M. Central 5HT<sub>1A</sub>-receptor binding in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 1991; 5(3): 259 -62.

20. Villalobos-Molina R., Lopez-Guerrero J.J., Ibarra M. The hypotensive effect of VMY 7378 is antagonized by a silent 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist: comparison with 8-hydroxy-dipropylamino tetralin. *Arch. Med. Res.* 2001; Vol. 32(5): 389-93.

21. Villalobos-Molina R., Orozco-Mendez M., Lopez-Guerrero J.J. et al. WAY 405, a new silent 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist with low affinity for vascular alpha<sub>1</sub>-adrenoceptors. *Auton. Autacoid. Pharmacol.* 2005; 25(4): 185-9.

22. Кожевникова Л.М., Авдонин П.П., Суханова И.Ф., Авдонин П.В. Роль десенситизации глюкокортикоидных рецепторов в развитии резистентности сосудов к эндогенным вазоконстрикторам при травматическом шоке. *Вестник РАМН.* 2007; (6): 3-8.

23. Кожевникова Л.М., Авдонин П.П., Суханова И.Ф., Авдонин П.В. Инверсия ответа на серотонин при травматическом шоке. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2008; 145(3): 266-9.

24. Scrogin K.E. 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT acts in the hindbrain to reverse the sympatholytic response to

severe hemorrhage. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2003; Vol. 284. — R782-R791.

25. Tiniakov R., Osei-Owusu P., Scrogin K.E. The 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor agonist, (+)-8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin, increases cardiac output and renal perfusion in rats subjected to hypovolemic shock. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007; Vol. 320: 811-8.

26. Ni W., Geddes T.J., Priestley J.R., Szasz T., Kuhn D.M., Watts S.W. The existence of a local 5-hydroxytryptaminergic system in peripheral arteries. *Br. J. Pharmacol.* 2008; 154(3): 663-74.

27. Dempsie Y., MacLean M.R. Pulmonary hypertension: therapeutic targets within the serotonin system. *Br. J. Pharmacol.* 2008; 155(4): 455-62.

28. Villalon C.M., Centurion D. Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine: a pharmacological update on the receptors/mechanisms involved and therapeutic implications. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2007; 376(1-2): 45-63.

29. Smits J., van Dorsten F., Struyker Boudier H. Interference of ketanserin with baroreflex control of the circulation in the conscious spontaneously hypertensive rat. *Drugs.* 1988; 36(1): 55-60.

30. Chau N.P., Pithoiss Merli I., Levenson J. et al. Comparative haemodynamic effects of ketanserin and ritanserin in the proximal and distal upper limb circulations of hypertensive patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1989; 37(3): 215-20.

31. Кожевникова Л.М., Авдонин П.В. Агонист 5HT<sub>1A</sub>-рецепторов серотонина 8-OH-DPAT увеличивает силу сокращения аорты и брыжеечной артерии крысы в присутствии эндотелина-1 или вазопрессина, но вызывает ослабление сосудов, предсокращенных норадреналином. *Изв. РАН. Сер. Биол.* 2010; 1: 44-53.

32. Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф., Авдонин П.В. Активация «молчащих» 5HT<sub>1A</sub>-рецепторов как возможный механизм синергизма действия ангиотензина II и серотонина на тонус сосудов. *Изв. РАН. Сер. Биол.* 2011; 1: 68-76.

33. Кожевникова Л.М., Давыдова А.Г., Авдонин П.В. Дезполяризация плазматической мембраны и активация рецепторов эндогенных вазоконстрикторов как возможные механизмы усиления вазоконстрикторного ответа на действие серотонина при травматическом шоке у крыс. *Изв. РАН. Сер. Биол.* 2009; 3: 343-57.

34. McGrew L., Price R.D., Hackler E., Chang M.S.S., Sanders-Bush E. RNA Editing of the Human Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> Receptor Disrupts Transactivation of the Small G-Protein RhoA. *Mol. Pharmacol.* 2004; Vol. 65: 252-6.

35. Turner J.H., Gelasco A.K., Raymond J.R. Calmodulin interacts with the third intracellular loop of the serotonin 5hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor at two distinct sites: putative role in receptor phosphorylation by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(17): 17027-37.

36. Turner J.H., Raymond J.R. Interaction of calmodulin with the serotonin 5hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor. A putative regulator of G protein coupling and receptor phosphorylation by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 2005; 280(35):30741-50.

37. Raymond J.R., Turner J.H., Gelasco A.K. et al. 5HT<sub>1</sub> Receptor signal transduction pathways. *The receptors: The serotonin receptors: from molecular pharmacology to human therapeutics.* Ed. Roth B.L. Totowa, New Jersey: Humana Press. Inc., 2006: 143-207.

38. Labasque M., Reiter E., Becamel C. et al. Physical interaction of calmodulin with the 5hydroxytryptamine<sub>2C</sub>

receptor C-terminus is essential for G protein-independent, arrestin-dependent receptor signaling. *Mol. Biol. Cell.* 2008; 9(11): 4640-50.

39. Кожевникова Л.М., Авдонин П.В. Участие кальмодулина в реализации вазоконстрикторных эффектов серотонина и норадреналина. *Изв. РАН. Сер. Биол.* 2012; 4: 430-7.

40. Hoyer D., Clarke D.E., Fozard J.R. et al. International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol. Rev.* 1994; Vol. 46: 157-203.

41. Smith B.M., Thomsen W.J., Grottick A.J. The potential use of selective 5HT<sub>2C</sub> adonists in treating obesity. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 2006; Vol. 15: 257-66.

42. Herrick-Davis K., Grinde E., Teitler M. Inverse agonist activity of atypical antipsychotic drugs at human 5-hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000; Vol. 295: 226-32.

43. Hoyer D., Hannon J.P., Martin G. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002; Vol. 71: 533-54.

44. Jones B.J., Blackburn T.P. The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002; Vol. 71: 555-68.

45. Miller K.J. Serotonin 5-HT<sub>2c</sub> receptor agonists: potential for the treatment of obesity. *Mol. Interv.* 2005; Vol. 5: 282-91.

46. Fitzgerald L.W., Iyer G., Conklin D.S., et al. Messenger RNA editing of the human serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor. *Neuropsychopharmacology.* 1999; Vol. 21: 82S-90S.

47. Niswender C.M., Copeland S.C., Herrick-Davis K., Emeson R.B., Sanders-Bush E. RNA editing of the human serotonin 5-hydroxytryptamine 2C receptor silences constitutive activity. *J. Biol. Chem.* 1999; Vol. 274: 9472-8.

48. Price R.D., Weiner D.M., Chang M.S., Sanders-Bush E. RNA editing of the human serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor alters receptor-mediated activation of G<sub>13</sub> protein. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(48): 44663-8.

49. Berg K.A., Dunlop J., Sanchez T., Silva M., Clarke W.P. A conservative, single-amino acid substitution in the second cytoplasmic domain of the human Serotonin<sub>2C</sub> receptor alters both ligand-dependent and -independent receptor signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008; 324(3):1084-92.

50. Berg K.A., Cropper J.D., Niswender C.M., Sanders-Bush E., Emeson R.B., Clarke W.P. RNA-editing of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor alters agonist-receptor-effector coupling specificity. *Br. J. Pharmacol.* 2001; Vol. 134: 386-92.

51. Herrick-Davis K., Grinde E., Weaver B.A. Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor homodimerization is not regulated by agonist or inverse agonist treatment. *Eur. J. Pharmacol.* 2007; 568(1-3): 45-53.

52. Chang M., Zhang L., Tam J.P., Sanders-Bush E. Dissecting G protein-coupled receptor signaling pathways with membrane-permeable blocking peptides. Endogenous 5-HT<sub>2C</sub> receptors in choroid plexus epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 2000; Vol. 275: 7021-9.

53. McGrew L., Chang M.S., Sanders-Bush E. Phospholipase D activation by endogenous 5-hydroxytryptamine 2C receptors is mediated by Galpha13 and pertussis toxin-insensitive Gbetagamma subunits. *Mol. Pharmacol.* 2002; Vol. 62: 1339-43.

54. Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф., Авдонин П.В. Изменение сократительных свойств и экспрессии АТ1А-рецепторов ангиотензина II в аорте крысы

в зависимости от функциональной активности глюкокортикоидных рецепторов. *Патогенез.* 2008; 6 (4): 47-51.

55. Heusler P., Pauwels P.J., Wurch T., Newman-Tancredi A., Tytgat J., Colpaert F.C., Cussac D. Differential ion current activation by human 5-HT<sub>1A</sub> receptors in *Xenopus oocytes*: evidence for agonist-directed trafficking of receptor signaling. *Neuropharmacology.* 2005; 49(7): 963-76.

56. Alioua A., Mahajan A., Nishimaru K., Zarei M.M., Stefani E., Toro L. Coupling of c-Src to large conductance voltage- and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels as a new mechanism of agonist-induced vasoconstriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99(22): 14560-5.

57. Кожевникова Л.М., Терехина И.Л., Авдонин П.В. Ингибиторы кальмодулина подавляют кальциевый сигнал от рецепторов серотонина в гладкомышечных клетках и устраняют вазоконстрикторный ответ на внутривенное введение серотонина. *Изв. РАН. Сер. Биол.* 2013; 3: 437-46.

58. Сукоян Г.В. Сигнасомы, строение, функция и дисфункция. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2012; 4: 15-29.

59. Sugimoto Y., Nakato T., Kita A., Takahashi Y., Hatae N., Tabata H., Tanaka S., Ichikawa A. A cluster of aromatic amino acids in the i2 loop plays a key role for Gs coupling in prostaglandin EP<sub>2</sub> and EP<sub>3</sub> receptors. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(12): 11016-26.

60. Flanagan C.A. A GPCR that is not «DRY». *Mol. Pharmacol.* 2005; 68(1): 1-3.

61. Labasque M., Meffre J., Carrat G., Becamel C., Boccaert J., Marin P. Constitutive activity of serotonin 2C receptors at G protein-independent signaling: modulation by RNA editing and antidepressants. *Mol. Pharmacol.* 2010; 78(5): 818-26.

62. Magalhaes A.C., Dunn H., Ferguson S.S. Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *Br. J. Pharmacol.* 2012; 165(6): 1717-36.

63. Bigford G.E., Chaudhry N.S., Keane R.W., Holohean A.M. 5-Hydroxytryptamine 5HT<sub>2C</sub> receptors form a protein complex with N-methyl-D-aspartate GluN2A subunits and activate phosphorylation of Src protein to modulate mono-neuronal depolarization. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(14): 11049-59.

## References

1. Buzzi M.G., Moskowitz M.A. The pathophysiology of migraine: year 2005. *J. Headache Pain.* 2005; 6: 105-11.

2. Eddahibi S., Adnot S. The serotonin pathway in pulmonary hypertension. *Arch. Mal. Coeur. Vaiss.* 2006; 99(6): 621- 5.

3. MacLean M.R., Herve P., Eddahibi S., Adnot S. 5-Hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 2000; 131: 161-8.

4. MacLean M.R., Dempsey Y. Serotonin and pulmonary hypertension from bench to bedside? *Curr. Opin. Pharmacol.* 2009; 9(3): 281-6.

5. Zhang B., Liu Yi., Luo Y., Niu W., Li Z.C. Alteration of Serotonin 2C Receptor Expression in the Aorta and the Pulmonary Artery in Rats Exposed to Hypoxia. *Chinese J. Physiol.* 2008; 51(6): 338-47.

6. Hara K., Hirowatari Y., Yoshika M., Komiyama Y., Tsuka Y., Takahashi H. The ratio of plasma to whole-blood serotonin may be a novel marker of atherosclerotic cardiovascular disease. *J. Lab. Clin. Med.* 2004; 144: 31-7.

7. Rapport M.M., Green A.A., Page I.H. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 1948; 176(3): 1243-51.
8. Nemecek G.M., Coughlin S.R., Handley D.A., Moskowitz M.A. Stimulation of aortic smooth muscle cell mitogenesis by serotonin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986; 83(3): 674-8.
9. Watts S.W., Fink G.D. 5-HT<sub>2B</sub>-receptor antagonist LY-272015 is antihypertensive in DOCA-salt-hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* 1999; 276: H944 -H952.
10. Russell A., Banas A., Berlin H., Fink G.D., Watts S.W. 5-Hydroxytryptamine(2B) receptor function is enhanced in the N(omega)-nitro-Larginine hypertensive rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002; 303: 179-87.
11. Watts S.W. 5-HT in systemic hypertension: foe, friend or fantasy? *Clin. Sci. (London)*. 2005; 108: 399-412.
12. Lebrech D. Portal hypertension: serotonin and pathogenesis. *Cardiovasc. Drugs. Ther.* 1990; 4(1): 33-5.
13. Zwieten, van P.A., Bruning T.A. Comparison of the hemodynamic effects of urapidil and flesinoxan in healthy volunteers. *Blood Press. Suppl.* 1994; 4: 19-24.
14. Davis R.P., Pattison J., Thompson J.M. et al. 5-hydroxytryptamine (5-HT) reduces total peripheral resistance during chronic infusion: direct arterial mesenteric relaxation is not involved. *BMC Pharmacology*. 2012; 12: 4.
15. Kozhevnikova L.M., Avdonin P.V. Disturbances in hormonal regulation of vascular tone during traumatic shock. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2006; 141(5): 511-4. (in Russian)
16. Zwieten, van P.A., Blauw G.J., van Brummelen P. Serotonergic receptors and drugs in hypertension. *Pharmacol. Toxicol.* 1992; 70(6): 17-22.
17. Diaz J., Ni W., Thompson J., King A., Fink G.D., Watts S.W. 5-Hydroxytryptamine lowers blood pressure in normotensive and hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008; 325: 1031-8.
18. Watts S.W., Morrison S.F., Davis R.P., Barman S.M. Serotonin and blood pressure regulation. *Pharmacol. Rev.* 2012; 64(2): 359- 88.
19. Huguet F., Brisac A.M. Central 5HT<sub>1A</sub>-receptor binding in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 1991; 5(3): 259 -62.
20. Villalobos-Molina R., Lopez-Guerrero J.J., Ibarra M. The hypotensive effect of BMY 7378 is antagonized by a silent 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist: comparison with 8-hydroxy-dipropylamino tetralin. *Arch. Med. Res.* 2001; 32(5): 389-93.
21. Villalobos-Molina R., Orozco-Mendez M., Lopez-Guerrero J.J. et al. WAY 405, a new silent 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist with low affinity for vascular alpha<sub>1</sub>-adrenoceptors. *Auton. Autacoid. Pharmacol.* 2005; 25(4): 185-9.
22. Kozhevnikova L.M., Avdonin P.P., Sukhanova I.F., Avdonin P.V. The role of desensitization of glucocorticoid receptors in the development of vascular resistance to endogenous vasoconstrictors in traumatic shock. 2007; (6); 3-8. (in Russian)
23. Kozhevnikova L.M., Avdonin P.P., Sukhanova I.F., Avdonin P.V. Inversion of the response to serotonin in rats with traumatic shock. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2008; 145(3): 266-9. (in Russian)
24. Scrogin K.E. 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT acts in the hindbrain to reverse the sympatholytic response to severe hemorrhage. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2003; 284: R782-R791.
25. Tiniakov R., Osei-Owusu P., Scrogin K.E. The 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor agonist, (+)-8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin, increases cardiac output and renal perfusion in rats subjected to hypovolemic shock. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007; 320: 811-8.
26. Ni W., Geddes T.J., Priestley J.R., Szasz T., Kuhn D.M., Watts S.W. The existence of a local 5-hydroxytryptaminergic system in peripheral arteries. *Br. J. Pharmacol.* 2008; 154(3): 663-74.
27. Dempsie Y., MacLean M.R. Pulmonary hypertension: therapeutic targets within the serotonin system. *Br. J. Pharmacol.* 2008; 155(4): 455-62.
28. Villalon C.M., Centurion D. Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine: a pharmacological update on the receptors/mechanisms involved and therapeutic implications. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2007; 376(1-2): 45-63.
29. Smits J., van Dorsten F., Struyker Boudier H. Interference of ketanserin with baroreflex control of the circulation in the conscious spontaneously hypertensive rat. *Drugs*. 1988; 36(1): 55-60.
30. Chau N.P., Pithoiss Merli I., Levenson J. et al. Comparative haemodynamic effects of ketanserin and ritanserin in the proximal and distal upper limb circulations of hypertensive patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1989; 37(3): 215-20.
31. Kozhevnikova L.M., Avdonin P.V. Agonist of serotonin 5HT<sub>1A</sub>-receptors 8-OH-DPAT increases the force of contraction of rat aorta and mesenteric artery in the presence of endothelin-1 or vasopressin and causes relaxation of the vessels precontracted with noradrenaline. *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.* 2010; (1): 44-53. (in Russian)
32. Kozhevnikova L.M., Avdonin P.V., Sukhanova I.F. Activation of «silent» vasoconstrictive 5-HT<sub>1A</sub> receptors as a possible mechanism of synergism in angiotensin ii and serotonin effect on vascular tone. *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.* 2011; (1): 68-76. (in Russian)
33. Kozhevnikova L.M., Davydova A.G., Avdonin P.V. Plasma membrane depolarization and activation of receptors for endogenous vasoconstrictors as possible mechanisms of potentiation of vasoconstrictive response to serotonin in traumatic shock in rats. *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.* 2009; (3): 343-57. (in Russian)
34. McGrew L., Price R.D., Hackler E., Chang M.S.S., Sanders-Bush E. RNA Editing of the Human Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> Receptor Disrupts Transactivation of the Small G-Protein RhoA. *Mol. Pharmacol.* 2004; 65: 252-6.
35. Turner J.H., Gelasco A.K., Raymond J.R. Calmodulin interacts with the third intracellular loop of the serotonin 5hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor at two distinct sites: putative role in receptor phosphorylation by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(17): 17027-37.
36. Turner J.H., Raymond J.R. Interaction of calmodulin with the serotonin 5hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor. A putative regulator of G protein coupling and receptor phosphorylation by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 2005; 280(35): 30741-50.
37. Raymond J.R., Turner J.H., Gelasco A.K. et al. 5HT Receptor signal transduction pathways. The receptors: The serotonin receptors: from molecular pharmacology to human therapeutics / Ed. Roth B.L. Totowa, New Jersey: Humana Press. Inc. 2006; 143-207.
38. Labasque M., Reiter E., Becamel C. et al. Physical interaction of calmodulin with the 5hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptor C-terminus is essential for G protein-independent, arrestin-dependent receptor signaling. *Mol. Biol. Cell.* 2008; 9(11): 4640-4650.

39. Kozhevnikova L.M., Avdonin P.V. Involvement of calmodulin in realization of vasoconstrictive effects of serotonin and norepinephrine. *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.* 2012; (4): 430-437. (in Russian)
40. Hoyer D., Clarke D.E., Fozard J.R. et al. International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol. Rev.* 1994; 46: 157-203.
41. Smith B.M., Thomsen W.J., Grottick A.J. The potential use of selective 5-HT<sub>2C</sub> agonists in treating obesity. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 2006; 15: 257-66.
42. Herrick-Davis K., Grinde E., Teitler M. Inverse agonist activity of atypical antipsychotic drugs at human 5-hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000; 295: 226-32.
43. Hoyer D., Hannon J.P., Martin G. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002; 71: 533-54.
44. Jones B.J., Blackburn T.P. The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002; 71: 555-68.
45. Miller K.J. Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonists: potential for the treatment of obesity. *Mol. Interv.* 2005; 5: 282-91.
46. Fitzgerald L.W., Iyer G., Conklin D.S., et al. Messenger RNA editing of the human serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor. *Neuropsychopharmacology.* 1999; 21: 825-90S.
47. Niswender C.M., Copeland S.C., Herrick-Davis K., Emeson R.B., Sanders-Bush E. RNA editing of the human serotonin 5-hydroxytryptamine 2C receptor silences constitutive activity. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 9472-8.
48. Price R.D., Weiner D.M., Chang M.S., Sanders-Bush E. RNA editing of the human serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor alters receptor-mediated activation of G<sub>13</sub> protein. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(48): 44663-8.
49. Berg K.A., Dunlop J., Sanchez T., Silva M., Clarke W.P. A conservative, single-amino acid substitution in the second cytoplasmic domain of the human Serotonin<sub>2C</sub> receptor alters both ligand-dependent and -independent receptor signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008; 324(3): 1084-92.
50. Berg K.A., Cropper J.D., Niswender C.M., Sanders-Bush E., Emeson R.B., Clarke W.P. RNA-editing of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor alters agonist-receptor-effector coupling specificity. *Br. J. Pharmacol.* 2001; 134: 386-92.
51. Herrick-Davis K., Grinde E., Weaver B.A. Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor homodimerization is not regulated by agonist or inverse agonist treatment. *Eur. J. Pharmacol.* 2007; 568(1-3): 45-53.
52. Chang M., Zhang L., Tam J.P., Sanders-Bush E. Dissecting G protein-coupled receptor signaling pathways with membrane-permeable blocking peptides. Endogenous 5-HT<sub>2C</sub> receptors in choroid plexus epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 7021-9.
53. McGrew L., Chang M.S., Sanders-Bush E. Phospholipase D activation by endogenous 5-hydroxytryptamine 2C receptors is mediated by G<sub>13</sub> and pertussis toxin-insensitive Gbetagamma subunits. *Mol. Pharmacol.* 2002; 62: 1339-43.
54. Kozhevnikova L.M., Sukhanova I.F., Avdonin P.V. Changes in the contractile properties and expression AT<sub>1A</sub>-receptors of angiotensin II in the rat aorta depending to the functional activity of the glucocorticoid receptors. *Pathogenesis.* 2008; 6(4): 47 — 51. Russian.
55. Heusler P., Pauwels P.J., Wurch T., Newman-Tancredi A., Tytgat J., Colpaert F.C., Cussac D. Differential ion current activation by human 5-HT<sub>1A</sub> receptors in *Xenopus* oocytes: evidence for agonist-directed trafficking of receptor signaling. *Neuropharmacology.* 2005; 49(7): 963-76.
56. Alioua A., Mahajan A., Nishimaru K., Zarei M.M., Stefani E., Toro L. Coupling of c-Src to large conductance voltage- and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels as a new mechanism of agonist-induced vasoconstriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99(22): 14560-5.
57. Kozhevnikova L.M., Zharkikh I.L., Avdonin P.V. Calmodulin inhibitors suppress calcium signaling from serotonin receptors in smooth muscle cells and abolish vasoconstrictive response on intravenous introduction of serotonin. *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.* 2013; (3): 437-46. (in Russian)
58. Sukoyan G.V. Signalosome as therapeutic targets. *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* 2012; 4: 15-29. (in Russian)
59. Sugimoto Y., Nakato T., Kita A., Takahashi Y., Hatae N., Tabata H., Tanaka S., Ichikawa A. A cluster of aromatic amino acids in the i2 loop plays a key role for Gs coupling in prostaglandin EP<sub>2</sub> and EP<sub>3</sub> receptors. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(12); P. 11016-26.
60. Flanagan C.A. A GPCR that is not «DRY». *Mol. Pharmacol.* 2005; 68(1): 1-3.
61. Labasque M., Meffre J., Carrat G., Becamel C., Bockert J., Marin P. Constitutive activity of serotonin 2C receptors at G protein-independent signaling: modulation by RNA editing and antidepressants. *Mol. Pharmacol.* 2010; 78(5): 818-26.
62. Magalhaes A.C., Dunn H., Ferguson S.S. Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *Br. J. Pharmacol.* 2012; 165(6): 1717-36.
63. Bigford G.E., Chaudhry N.S., Keane R.W., Holohean A.M. 5-Hydroxytryptamine 5HT<sub>2C</sub> receptors form a protein complex with N-methyl-D-aspartate GluN2A subunits and activate phosphorylation of Src protein to modulate motoneuronal depolarization. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(14): 11049-59.

Поступила 11.11.14

Received 11.11.14

**Сведения об авторах:**

Меситов Михаил Валентинович — к.б.н., с.н.с. лаб. регуляции агрегатного состояния крови ФГБНУ «НИИОПП», e-mail: michael.v.mesitov@gmail.com

Московцев Алексей Александрович — к.м.н., в.н.с. лаб. регуляции агрегатного состояния крови ФГБНУ «НИИОПП», e-mail: bioinf@mail.ru

Крупина Н.А., Орлова И.Н., Лукьянова Л.Д.

## **Влияние курсового применения биологически активного флавоноидсодержащего растительного препарата Экстралайф на уровень тревожности и сенсомоторную реактивность крыс**

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Клинико-эпидемиологические данные свидетельствуют о необходимости поиска средств терапии и профилактики состояний с повышенной тревожностью, связанных с эмоциональными и невротическими срывами и ухудшающих клинический прогноз психосоматических заболеваний. Особый интерес представляют лекарственные препараты растительного происхождения, длительный прием которых, как правило, хорошо переносится, а лечение дешевле по сравнению с лечением современными анксиолитиками. Цель настоящего исследования заключалась в изучении эффектов курсового приема флавоноид-содержащего препарата экстралайф растительного происхождения (водорастворимый экстракт *Pentaphylloides fruticosa*, 40 мг/кг в сутки, в течение 1 месяца) у «тревожных» и «нетревожных» беспородных белых крыс, выделенных в популяции путем отбора с помощью многопараметрового метода комплексной оценки тревожно-фобических состояний. Этим методом также оценивали выраженность тревожности (ситуационной тревоги) у крыс в динамике обследования. Сенсомоторную реактивность (эмоциональность) оценивали по характеристикам акустического стартл-ответа. Экстралайф не предотвращал увеличение ситуационной тревоги у «нетревожных» крыс и не изменял уровень тревожности у «тревожных» животных. Однако препарат снижал амплитуду акустического стартл-ответа у «тревожных» крыс и увеличивал латентность стартл-ответа как у «тревожных», так и у «нетревожных» животных, то есть уменьшал проявления вызываемой звуковым раздражителем тревоги по показателям сенсомоторной реактивности. Данные свидетельствуют о наличии у препарата экстралайф анксиолитического и успокаивающего действия. Эффект был более выражен у «тревожных» животных. У «нетревожных» крыс на фоне приема препарата отмечено транзитное снижение предстимульного торможения акустического стартл-ответа, что может быть связано с возникновением преходящих нарушений в психоэмоциональной сфере. Полученные данные свидетельствуют о том, что экстралайф в условиях курсового приема может оказывать негативное побочное действие на эмоциональность «нетревожных» животных, что определяет необходимость учета особенностей психоэмоционального статуса индивидуума при разработке терапевтических подходов к коррекции повышенной тревожности с включением этого препарата.

**Ключевые слова:** крысы; тревожно-фобический уровень; флавоноид-содержащий растительный препарат экстралайф; курсовой прием; сенсомоторная реактивность; акустический стартл-ответ

Krupina N.A., Orlova I.N., Lukyanova L.D.

## **Effect of course intake of bio-active flavonoids-containing plant preparation Extralife on the level of anxiety and sensorimotor reactivity in rats**

Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8, Baltiiskaya str., 125315, Moscow, Russia

Clinical and epidemiological data evidence the need to search for new substances for treatment and prevention of increased anxiety associated with emotional and neurotic breakdown and worsening clinical prognosis of psychosomatic diseases. Of particular interest are the drugs of plant origin, which are generally well tolerated under prolonged use, and treatment is cheaper as compared with modern anxiolytics. The purpose of this study was to investigate the effects of course taking a flavonoid-containing plant preparation Extralife (water-soluble extract *Pentaphylloides fruticosa*, 40 mg/kg per day for 1 month) in «anxious» and «non-anxious» inbred albino rats sampled in the population using a multi-parameter method for evaluating anxiety-phobic states. This method was also used for evaluating the severity of anxiety (state anxiety) in rats in the dynamics of the survey. Sensorimotor reactivity (emotionality) was assessed by the parameters of the acoustic startle response. Extralife did not prevent the increase in state anxiety in «non-anxious» rats and did not change the level of anxiety in the «anxious» animals. However, the drug reduced the amplitude of the acoustic startle response in the «anxious» animals and increased startle response latency in both «anxious» and «non-anxious» rats, that is reduced the symptoms of anxiety caused by alarm sound stimuli in terms of sensorimotor reactivity. The data testify to the anxiolytic and sedative effects of Extralife more pronounced in the «anxious» animals. In a course intake of Extralife

*«non-anxious» rats demonstrated transient decrease in the pre-pulse inhibition of the acoustic startle response, probably associated with the occurrence of transient disturbances in the psycho-emotional sphere. The findings suggest that Extralife in a course taking may have negative side effects on the emotionality of «non-anxious» animals that determines the need to incorporate the features of mental and emotional status of the individual in the development of therapeutic approaches to the correction of high anxiety with the inclusion of the drug.*

**Key words:** rats; anxiety-phobic level; flavonoid-containing plant preparation Extralife; course intake; sensorimotor reactivity; acoustic startle response

Тревожность в обобщенном понимании специалистов-психологов и нейрофизиологов — это переживание эмоционального дискомфорта, повышенного беспокойства и настороженности, связанное с ожиданием неблагоприятия, с предчувствием угрозы или неудачи в специфических социальных ситуациях [1—3]. Тревожность является формой эмоционального реагирования, входящей в репертуар нормальной поведенческой активности животных и человека. Принято выделять личностную тревожность, характеризующую индивидуум (врожденное свойство личности), и ситуативную тревожность (связанную с конкретной внешней ситуацией). Усиление тревожности до степени, неадекватной внешним воздействиям, характерно для целого ряда расстройств психоневрологического спектра [3, 4]. Очень высокая личностная тревожность прямо коррелирует с наличием невротического конфликта, с эмоциональными и невротическими срывами и психосоматическими заболеваниями [5]. Высокий уровень тревожности, как личностной, так и ситуативной, влияет на развитие и течение психосоматических заболеваний [6], ухудшая клинический прогноз. Расстройства эмоциональной регуляции, проявляющиеся ростом тревожности, могут приводить к нарушениям социального поведения, в частности, к росту агрессии [7].

Клинико-эпидемиологические данные свидетельствуют об острой необходимости поиска методов и средств терапии и профилактики состояний с повышенной тревожностью, для чего в настоящее время используются различного рода анксиолитики, имеющие, как правило, нежелательные побочные эффекты. В то же время лекарственные препараты из растений, как правило, безвредны, хорошо переносятся, могут назначаться длительное время, а лечение ими дешевле, чем синтетическими препаратами [8, 9]. Кроме того, растительные препараты, как правило, обладают широким спектром фармакологической активности, который может быть обусловлен наличием в их составе большого количества биологически активных полифенольных соединений (биофлавоноидов) [10].

Обязательным этапом поиска новых фитопрепаратов с анксиолитическим действием являются доклинические исследования [11]. Ранее мы разработали метод комплексной оценки тревожно-фобических состояний у крыс [12], который дает возможность выделять в популяции животных с высоким и низким тревожно-фобическим уровнем. Результаты фармакологического анализа позволяют рассматривать особей с высоким тревожно-фобическим уровнем в качестве естественной модели повышенной тревожности у крыс [13]. Повышенная тревожность и страх усиливают сенсомоторную реактивность (показатель эмоциональности) по показателям стартл-ответа у людей и животных [14—17], поэтому оценка характеристик реакции вздрагивания, в частности, в акустическом стартл-рефлексе, рекомендована для скрининга потенциальных анксиолитиков в доклинических исследованиях [18, 19].

Ранее нами было показано, что экстракт курильского чая (лат. *Pentaphylloides fruticosus*, Лапчатка кустарниковая) — экстралайф (ЭЛФ) — обладает седативными, анксиолитическими и антидепрессивными свойствами [20]. Целью настоящей работы было исследование эффектов курсового применения экстралайфа на уровень тревожности и характеристики сенсомоторной реактивности в акустическом стартл-рефлексе у крыс с высоким и низким тревожно-фобическим уровнем.

## Методика

Работа проведена на 36 беспородных белых крысах, достигших возраста 3—4 мес. в начале исследования. Крысы содержались в стандартных условиях вивария по 5 особей в клетке с естественной сменой освещенности и свободным доступом к пище и воде. Все процедуры и эксперименты на животных проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ №708н от 23.08.2010 г.

Оценка тревожно-фобического уровня у крыс. Метод комплексной оценки тревожно-фобических состояний у крыс [12] основан на интегральной количественной оценке изменения видоспецифических поведенческих ответов у крыс в серии этологически адекватных тест-стимулов, моделирующих мягкое

Для корреспонденции: Крупина Наталья Александровна, д.биол.н., гл. науч. сотр., лаб. общей патологии нервной системы, e-mail: krupina-na@yandex.ru

стрессогенное воздействие, которое провоцирует проявление состояний тревожности и страха у животных.

После первого обследования по шкале для оценки тревожно-фобических состояний (за 2 недели до начала применения ЭЛФ) животных разделяли на крыс с низким уровнем тревожности (условно «нетревожные», набравшие <8 баллов) и высоким уровнем тревожности (условно «тревожные», набравшие  $\geq 8$  баллов, — собственно, естественная модель повышенной тревожности). Учитывая, что оценку эмоционального состояния животных проводили в ситуациях мягкого стрессирования, рассчитанный в баллах тревожно-фобический уровень фактически является результатом аддитивности врожденного тревожно-фобического уровня и уровня ситуационной тревожности в ответ на действие внешних факторов. Изменение тревожно-фобического уровня у крыс оценивали через 2 и 4 нед. применения ЭЛФ, а также через 2 нед. после отмены препарата. Для обследования животных брали группами по 5 крыс в каждой. В состав каждой группы входили как «нетревожные», так и «тревожные» животные.

*Оценка двигательной и исследовательской активности крыс.* Оценку двигательной (по числу пересеченных квадратов) и исследовательской (по числу стоек) активности у животных проводили суммарно за 3 мин наблюдения в стандартном тесте «открытого поля» [12]. Обследование крыс проводили за 2 нед. до начала применения ЭЛФ, через 2 и 4 нед. его применения, а также через 2 нед. после отмены ЭЛФ.

*Сенсомоторную реактивность* оценивали по показателям АСО. Измерение параметров стартл-ответа проводили в модульной установке «STARTLE RESPONSE SYSTEM» для автоматизированной оценки сенсомоторной реактивности одновременно у двух крыс на IBM PC/AT с оригинальным программным обеспечением для сбора и первичной обработки сигналов («Coulbourn Instruments», USA), как описано ранее [14]. В качестве модулирующего предстимульного и основного стимулирующего сигналов использовали вспышки белого шума со следующими характеристиками: предстимульный сигнал — 20 мс, 80 дБ (подпороговое значение); основной сигнал — 40 мс, 120 дБ (сверхпороговое значение).

Амплитуду и латентность АСО, характеризующие, соответственно, эффективность и скорость передачи сигнала в нервной цепи акустического стартл-рефлекса, определяли автоматически, по максимальному напряжению, пропорциональному скорости смещения пьезоэлектрического акселерометра платформы, и по времени достижения максимального пика АСО в течение 200-мс интервала с момента по-

дачи основного сигнала. Тестирование заключалось в предъявлении крысам после 60-секундного адаптационного периода серии из чередующихся в случайном порядке 30 сигналов двух типов: первый тип — только основной сигнал (оценивали показатели ответа — амплитуда  $A_1$ , усл.г; латентность  $L_1$ , мс); второй тип — последовательность модулирующего и основного сигналов, интервал между которыми составлял 100 мс (оценивали показатель ответа — амплитуда  $A_2$ , усл.г; латентность  $L_2$ , мс). Интервалы между сигналами двух типов были рандомизированы (в пределах от 20 до 40 с, средний интервал составлял  $30,1 \pm 1,2$  с). Для каждого животного автоматически рассчитывали средние величины  $A_1$ ,  $L_1$ ,  $A_2$  и  $L_2$  по 15 предъявлениям каждого типа сигнала. Время принудительной вентиляции камеры составляло 10 с после каждого предъявления сигнала первого или второго типа.

Относительная величина снижения амплитуды стартл-ответа на сверхпороговый сигнал в условиях его предшествующей модуляции подпороговым сигналом характеризует так называемое предстимульное торможение (ПСТ), которое является самостоятельной физиологической характеристикой стартл-ответа, опосредуется активным тормозным процессом в ЦНС [21] и изменяется при нарушениях психической деятельности [22]. По величине ПСТ можно судить об эффективности процессов фильтрации входного сигнала, то есть об эффективности функционирования сенсомоторного входа — процессов, вносящих вклад в способность фокусировать внимание [23], что необходимо для осуществления различных видов когнитивной деятельности. Расчет ПСТ для каждого животного проводили по следующей формуле:  $\text{ПСТ}(\%) = 100\% - A_2/A_1 \cdot 100\%$ , где  $A_1$  и  $A_2$  — усредненные величины ответа на сигналы первого и второго типов, величина  $A_1$  принята за 100%. Рассчитывали средние значения ПСТ в группах.

Оценку сенсомоторной реактивности осуществляли в динамике обследования: за 2 недели до начала применения ЭЛФ, через 2 и 4 недели его применения, а также через 2 и 4 недели после отмены ЭЛФ.

*Курсовое введение ЭЛФ.* В течение месяца крыс поили водным раствором ЭЛФ, приготовленным из расчета примерного его потребления в дозе 40 мг/кг в сут; контрольных крыс поили водой. По результатам первичного обследования по шкале для оценки тревожно-фобических состояний крысы были разделены на 2 группы «тревожных» и «нетревожных» животных, каждая из которых, в свою очередь, была разделена на 2 подгруппы: контрольную (питье воды) и опытную (питье водного раствора ЭЛФ). Подгруппы были сформированы таким образом, чтобы исходные средние величины уровня тревожности,



двигательной активности, амплитуды А1, латентности М1 и ПСТ в акустическом стартл-рефлексе у крыс в соответствующих по величине уровня тревожности подгруппах не различались. В итоге, были сформированы следующие 4 подгруппы животных:

- 1) «тревожные», ЭЛФ (n = 9);
- 2) «тревожные», контроль (n = 9);
- 3) «нетревожные», ЭЛФ (n = 9);
- 4) «нетревожные», контроль (n = 9).

Статистическую обработку данных проводили по алгоритмам программы «STATISTICA for Windows 6.0». Предварительная проверка по критерию Колмогорова—Смирнова выявила соответствие распределения эмпирических данных нормальному закону, на основании чего статистический анализ проводили с использованием параметрических критериев: для выявления влияния факторов «Тревожность» (исходно «тревожные»/исходно «нетревожные» животные), «Группа» (контроль/ЭЛФ) и «Повторные измерения» (динамика обследования) использовали многофакторный дисперсионный анализ, для выявления различий при повторных измерениях в каждой группе применяли однофакторный дисперсионный анализ для повторных измерений REPEATED MEASURES ANOVA с последующим множественным попарным сравнением средних значений в рядах дисперсионного комплекса по Fisher LSD тесту, для сравнения двух независимых групп использовали непарный параметрический t-критерий Стьюдента при принятом 5%-ном уровне значимости.

## Результаты и обсуждение

### *Динамика тревожности и ориентировочно-исследовательской деятельности*

По результатам многофакторного анализа выявлено влияние фактора «Повторные измерения» ( $F = 21,5$ ;  $p < 0,001$ ) и фактора «Тревожность» ( $F = 16,1$ ;  $p < 0,001$ ) на динамику тревожности в подгруппах. Установлено взаимодействие этих факторов

( $F = 14,4$ ;  $p < 0,001$ ). По результатам однофакторного дисперсионного анализа ЭЛФ не изменял уровень тревожности у «тревожных» животных в динамике обследования [ЭЛФ:  $F(3,24) = 1,833$ ,  $p = 0,168$ ; контроль:  $F(3,24) = 0,139$ ,  $p = 0,936$ ] и не предотвращал увеличение тревожно-фобического уровня у «нетревожных» крыс [ЭЛФ:  $F(3, 24) = 22,987$ ;  $p < 0,001$ ; контроль:  $F(3, 24) = 24,242$ ,  $p < 0,001$ ] (табл. 1).

По результатам многофакторного анализа выявлено влияние фактора «Повторные измерения» ( $F = 13,8$ ;  $p < 0,001$ ) на динамику двигательной активности в подгруппах, влияние фактора «Тревожность» не достигло уровня статистической значимости ( $F = 3,6$ ;  $p = 0,066$ ). Однако установлено взаимодействие этих факторов ( $F = 3,7$ ;  $p = 0,014$ ).

По результатам однофакторного дисперсионного анализа ЭЛФ в условиях курсового применения не влиял на двигательную активность «тревожных» крыс [ЭЛФ:  $F(3,24) = 2,269$ ,  $p = 0,106$ ; контроль:  $F(3,24) = 0,822$ ,  $p = 0,494$ ] и не предотвращал характерное для контрольных «нетревожных» животных снижение двигательной активности [ЭЛФ:  $F(3,24) = 3,663$ ,  $p = 0,026$ ; контроль:  $F(3,24) = 15,647$ ,  $p < 0,001$ ] (табл. 2). Через 2 нед. после отмены ЭЛФ двигательная активность «нетревожных» крыс, в отличие от контроля, не повышалась.

По результатам многофакторного анализа выявлено влияние фактора «Повторные измерения» ( $F = 25,9$ ;  $p < 0,001$ ) на динамику исследовательской (вертикальной) активности в подгруппах. Влияние фактора «Тревожность» не достигло уровня статистической значимости ( $F = 2,9$ ;  $p = 0,101$ ). Установлено взаимодействие факторов «Повторные измерения» и «Тревожность» ( $F = 3,4$ ;  $p = 0,021$ ), а взаимодействие факторов «Группа» и «Тревожность» не достигло уровня статистической значимости ( $F = 3,5$ ;  $p = 0,071$ ). По результатам однофакторного дисперсионного анализа курсовое применение ЭЛФ препят-

Таблица 1

Изменение уровня тревожности у «тревожных» и «нетревожных» крыс в процессе курсового применения экстралайфа в сравнении с контролем

| Срок обследования (прием ЭЛФ или воды) | Тревожно-фобический уровень (в баллах) |             |                  |             |
|--|--|-------------|------------------|-------------|
|  | "Тревожные"                            |             | "Нетревожные"    |             |
|  | Контроль (n = 9)                       | ЭЛФ (n = 9) | Контроль (n = 9) | ЭЛФ (n = 9) |
| До приема                              | 10,3 ± 0,6                             | 9,7 ± 0,6   | 4,5 ± 0,7        | 4,3 ± 0,4   |
| 2 недели потребления                   | 10,7 ± 0,8                             | 9,6 ± 0,8   | 8,4 ± 0,8 #      | 8,0 ± 1,0 # |
| 4 недели потребления                   | 10,7 ± 0,9                             | 11,2 ± 0,6  | 8,4 ± 0,7 #      | 9,7 ± 1,1 # |
| 2 недели после отмены                  | 10,5 ± 0,8                             | 9,5 ± 1,0   | 8,2 ± 0,8 #      | 9,6 ± 0,8 # |

Примечание. #  $p < 0,05$  — по сравнению с исходным значением показателя в данной подгруппе (однофакторный дисперсионный анализ для повторных измерений с апостериорным сравнением по Fisher LSD тесту); n — число животных в группе.

ствовало снижению исследовательской активности у «тревожных» крыс [ЭЛФ:  $F(3,24) = 2,335$ ,  $\rho = 0,099$ ; контроль:  $F(3,24) = 8,371$ ,  $\rho = 0,001$ ] и не предотвращало снижения исследовательской активности у «нетревожных» животных [ЭЛФ:  $F(3,24) = 5,993$ ,  $\rho = 0,003$ ; контроль:  $F(3,24) = 12,563$ ,  $\rho < 0,001$ ] на протяжении всего периода приема препарата, а также после его отмены (табл. 3).

#### Динамика сенсомоторной реактивности (эмоциональности)

По результатам многофакторного анализа дисперсионного комплекса выявлено влияние фактора «Повторные измерения» для показателей А2, ПСТ и Л1 (соответственно,  $F = 3,2$ ;  $3,0$ ;  $4,6$  и  $\rho = 0,016$ ;  $0,022$ ;  $0,002$ ). Влияние этого фактора для показателя А1 не достигло уровня статистической значимости ( $F = 2,1$ ;  $\rho = 0,080$ ). Наблюдалась тенденция к взаимодействию факторов «Группа» и «Тревожность» для показателя ПСТ ( $F = 2,2$ ;  $\rho = 0,146$ ).

В подгруппе «тревожных» крыс, потреблявших ЭЛФ, обнаружена выраженная тенденция к снижению амплитуды модулированного АСО А2 [ $F(4,32) = 2,103$ ,  $\rho = 0,103$ ; здесь и далее

REPEATED MEASURES ANOVA] и статистически значимое увеличение латентности модулированного АСО А2 [ $F(4,32) = 2,872$ ,  $\rho = 0,039$ ] на протяжении всего периода наблюдения (рис. 1, 2). В контрольной подгруппе «тревожных» крыс, потреблявших воду, в динамике обследования не обнаружено изменений ни по одному из показателей АСО. Через 2 недели от начала потребления ЭЛФ амплитуды АСО А1 и А2 были статистически значимо меньше соответствующего контрольного уровня, а латентность А2 спустя 2 недели после отмены ЭЛФ, напротив, превышала контрольное значение.

В подгруппе подопытных «нетревожных» крыс спустя месяц потребления ЭЛФ обнаружено снижение величины ПСТ [ $F(4,32) = 2,911$ ;  $\rho = 0,037$ ] (рис. 3) и увеличение латентности немодулированного АСО Л1 [ $F(4,32) = 3,209$ ;  $\rho = 0,025$ ] (рис. 2). ПСТ восстанавливалось до исходных значений спустя месяц после отмены приема ЭЛФ, тогда как латентность немодулированного АСО оставалась повышенной относительно исходной величины в течение месяца наблюдения после отмены ЭЛФ. В соответствующей контрольной группе не выявлено статистически значимых изменений ни по одному из показателей, однако отмечена тенденция к снижению ампли-

Таблица 2

Изменение двигательной активности у «тревожных» и «нетревожных» крыс в процессе курсового применения экстралайфа в сравнении с контролем

| Срок обследования (прием ЭЛФ или воды) | Двигательная активность (число пересеченных квадратов) |             |                  |              |
|--|--|-------------|------------------|--------------|
|  | "Тревожные"  |             | "Нетревожные"    |              |
|  | Контроль (n = 9)                                       | ЭЛФ (n = 9) | Контроль (n = 9) | ЭЛФ (n = 9)  |
| До приема                              | 13,8 ± 3,8   | 20,6 ± 6,4  | 38,1 ± 4,4       | 30,0 ± 8,5   |
| 2 недели потребления                   | 13,1 ± 3,7   | 11,2 ± 2,5  | 18,6 ± 4,5 # *   | 11,6 ± 4,6#  |
| 4 недели потребления                   | 10,7 ± 3,9   | 8,3 ± 2,0   | 9,1 ± 2,3 #      | 12,8 ± 6,1#  |
| 2 недели после отмены                  | 8,8 ± 3,3  | 11,8 ± 3,0  | 20,0 ± 5,8 # *   | 6,0 ± 2,8 #+ |

Примечание. #  $p < 0,05$  — по сравнению с исходным значением показателя в данной подгруппе; +  $p < 0,05$  — по сравнению с соответствующим контрольным значением на том же сроке обследования (непарный параметрический t-критерий Стьюдента); \*  $p < 0,001$  — по сравнению со значением показателя в данной подгруппе через 4 недели потребления (однофакторный дисперсионный анализ для повторных измерений с апостериорным сравнением по Fisher LSD тесту); n — число животных в группе.

Таблица 3

Изменение исследовательской активности у «тревожных» и «нетревожных» крыс в процессе курсового применения экстралайфа в сравнении с контролем

| Срок обследования (прием ЭЛФ или воды) | Исследовательская активность (число стоек) |             |                  |             |
|--|--|-------------|------------------|-------------|
|  | "Тревожные"                                |             | "Нетревожные"    |             |
|  | Контроль (n = 9)                           | ЭЛФ (n = 9) | Контроль (n = 9) | ЭЛФ (n = 9) |
| До приема                              | 6,2 ± 0,9                                  | 6,1 ± 1,1   | 12,6 ± 1,6       | 8,4 ± 2,3   |
| 2 недели потребления                   | 1,7 ± 0,5 #                                | 3,4 ± 1,3   | 3,4 ± 1,1 #      | 3,7 ± 1,7 # |
| 4 недели потребления                   | 2,1 ± 0,9 #                                | 3,8 ± 1,4   | 3,0 ± 1,0 #      | 2,7 ± 0,9 # |
| 2 недели отмены                        | 1,7 ± 0,9 #                                | 3,7 ± 0,8   | 5,8 ± 2,1 #      | 1,6 ± 0,6 # |

Примечание. #  $p < 0,05$  по сравнению с исходным значением показателя в данной подгруппе (однофакторный дисперсионный анализ для повторных измерений с апостериорным сравнением по Fisher LSD тесту); n — число животных в группе

туды и увеличению латентности немодулированного АСО [соответственно, А1:  $F(4,32) = 2,158$ ;  $p = 0,096$  и Л1:  $F(4,32) = 2,146$ ;  $p = 0,098$ ].

Таким образом, ответ «тревожных» и «нетревожных» крыс на курсовой прием ЭЛФ по показателям ориентировочно-исследовательской деятельности и сенсомоторной реактивности оказался различным.

Как сказано выше, процедура обследования по шкале для оценки тревожно-фобических состояний предполагает действие на крыс ряда мягких стресс-раздражителей. Ранее нами показано, что многократное обследование по шкале с интервалом не менее недели приводит к повышению тревожно-фобического уровня у «нетревожных» крыс Вистар,

подвергнутых депрессогенному воздействию, и не изменяет уровень тревожности у исходно «нетревожных» контрольных крыс [24]. В настоящей работе при двухнедельном интервале обследования мы выявили стойкое увеличение уровня тревожности у беспородных «нетревожных» крыс как опытной, так и контрольной подгрупп. Вероятно, чувствительность линейных и беспородных «нетревожных» крыс к процедуре многократного обследования в батарее тестов, моделирующих мягкое стресс-воздействие, различается, что может быть связано с особенностями генетически обусловленных изменений активности стресс-лимитирующих систем в процессе адаптации этих животных [25].

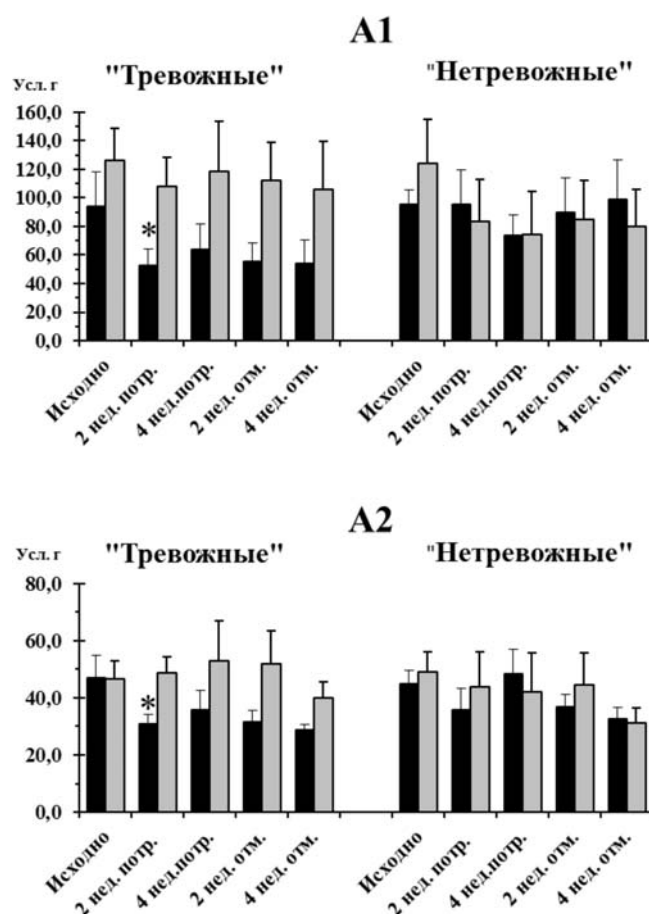


Рис. 1. Амплитуда немодулированного (А1) и модулированного (А2) акустического стартл-ответа у «тревожных» и «нетревожных» крыс на фоне курсового приема ЭЛФ и после его отмены в сравнении с контролем (питье воды).

Черные столбики — питье раствора ЭЛФ, опыт; серые столбики — питье воды, контроль.

2 нед.потр. — 2 недели потребления; 4 нед.потр. — 4 недели потребления; 2 нед.отм. — 2 недели отмены; 4 нед.отм. — 4 недели отмены. По оси ординат — амплитуда АСО, усл.г.

\*  $p < 0,05$  — по сравнению с соответствующим контрольным значением на том же сроке обследования (непарный параметрический t-критерий Стьюдента).

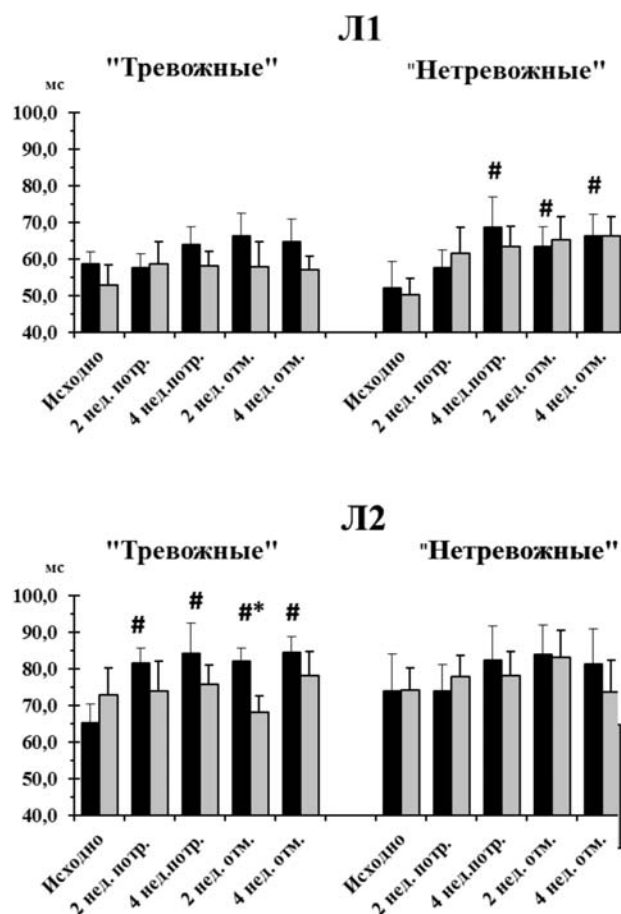


Рис. 2. Латентность немодулированного (Л1) и модулированного (Л2) акустического стартл-ответа у «тревожных» и «нетревожных» крыс на фоне курсового приема ЭЛФ и после его отмены в сравнении с контролем (питье воды).

По оси ординат — латентность АСО, мс. Остальные обозначения как на рис. 1.

#  $p < 0,05$  — по сравнению с исходным значением показателя в данной подгруппе крыс (однофакторный дисперсионный анализ для повторных измерений с последующим Fisher LSD тестом); \* $p < 0,05$  — по сравнению с соответствующим контрольным значением на том же сроке обследования (непарный параметрический t-критерий Стьюдента).

В пользу представлений о стрессорирующем эффекте процедуры многократного обследования у беспородных «нетревожных» крыс свидетельствовало также угнетение у контрольных животных ориентировочно-исследовательской деятельности, проявлявшееся снижением как двигательной, так и исследовательской активности. Такое угнетение нельзя объяснить лучшим по сравнению с «тревожными» животными привыканием к обследованиям в «открытом поле», так как оно сопровождалось ростом ситуационной тревожности. ЭЛФ не влиял на уровень ситуационной тревожности и показатели ориентировочно-исследовательской деятельности у «нетревожных» крыс, что позволяет прийти к заключению об отсутствии антистрессорного действия препарата у особей с низким тревожно-фобическим уровнем. У «тревожных» крыс в динамике обследования уровень тревожности и двигательной активности не изменялся, тогда как исследовательская активность снижалась, и курсовое применение ЭЛФ предотвращало это снижение. Возможно, снижение вертикальной активности связано с развитием процессов неассоциативного обучения — привыкания. Однако этому противоречат данные об отсутствии снижения локомоций и уровня тревожности в динамике обследования у исходно «тревожных» крыс. По совокупности данных нельзя исключить связь снижения исследовательской активности с ответом на стресс-воздействие при многократном обследовании, и в таком случае эффекты ЭЛФ у «тревожных» крыс следует рассматривать

как антистрессорные. Предположение о возможном влиянии ЭЛФ на когнитивную деятельность в зависимости от уровня тревожности особей требует специальной проверки. Тем не менее, можно говорить о том, что по эмоционально-поведенческим показателям «тревожные» крысы оказались более устойчивы к действию многократного «мягкого» стрессирования, чем «нетревожные» и, возможно, более чувствительны к антистрессорному действию ЭЛФ. В целом, отобранные по шкале для оценки тревожно-фобических состояний «тревожные» и «нетревожные» крысы представляют два разных типа реагирования в стрессогенной ситуации, подобно различающимся по устойчивости к стресс-воздействию активным и пассивным крысам, отобранным по величине индекса активности в тесте «открытого поля» [26].

Несмотря на то, что исходно «тревожные» и «нетревожные» крысы не различались по показателям АСО, только «тревожные» животные демонстрировали снижение амплитуды АСО на фоне курсового приема ЭЛФ. Известно, что увеличение стартл-ответа по показателю амплитуды АСО характерно для состояний тревожности и страха [16]. С учетом этого, уменьшение амплитуды АСО у «тревожных» крыс под влиянием ЭЛФ, отражающее снижение эмоциональной реактивности животных, с высокой вероятностью свидетельствует о наличии у препарата свойств анксиолитика. Кроме того, можно предполагать наличие у ЭЛФ седативного (успокаивающего) действия, проявляющегося у тревожных особей. На первый взгляд, в противоречие с этим заключением входит тот факт, что снижение амплитуды АСО не сопровождалось уменьшением уровня тревожности у крыс, определяемого по шкале для оценки тревожно-фобических состояний. У «нетревожных» крыс рост ситуационной тревожности при многократных обследованиях также не сопровождался увеличением амплитуды АСО как в контрольной, так и в опытной подгруппах. В качестве одного из объяснений этих кажущихся противоречий можно привлечь представления о селективности тревожных состояний, суть которых сводится к тому, что тревожность гетерогенна по структурно-функциональному базису в ЦНС, и разные ситуации выявляют различную тревожность [16, 27]. Подобная селективность, отражающая дифференцирование тревоги в зависимости от класса теста, лежит в основе многопрофильной оценки личности в клинике, а несовпадение разных шкал тревоги и полученных по ним оценок имеет самостоятельное диагностическое значение [28]. В свете этих представлений тревогу, возникающую в акустическом стартл-рефлексе при действии информационно значимых сверхпороговых сенсорных стимулов, можно называть «акустической».

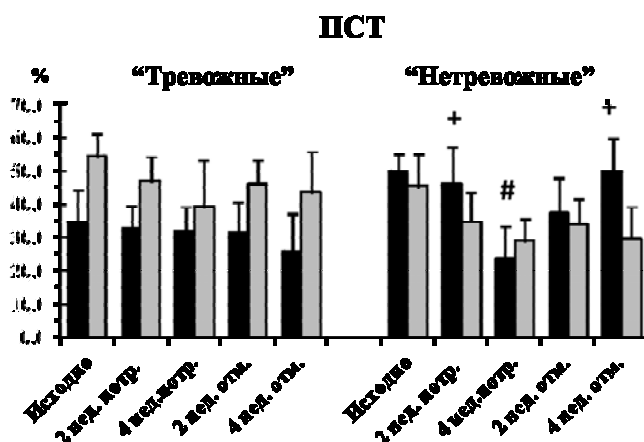


Рис. 3. Предстимульное торможение (ПСТ) акустического стартл-ответа у «тревожных» и «нетревожных» крыс на фоне курсового приема ЭЛФ и после его отмены в сравнении с контролем (питье воды).

По оси ординат — предстимульное торможение АСО, %. Остальные обозначения как на рис. 1.

#  $p < 0,05$  — по сравнению с исходным значением показателя в данной подгруппе крыс; +  $p < 0,05$  — по сравнению со значением через 4 недели от начала потребления ЭЛФ (однофакторный дисперсионный анализ для повторных измерений с последующим Fisher LSD тестом).

Для «акустической» тревоги, помимо повышения амплитуды стартл-ответа, характерно также снижение его латентности, которое может быть вызвано увеличением возбудимости в слуховой коре, которая, в свою очередь, по нисходящим путям облегчает συναптическую передачу в латеральной петле, вызывая снижение латентности и увеличение частоты разрядов нейронов, отвечающих на звуковой стимул [14, 29]. Можно полагать, что увеличение латентности стартл-ответа при отсутствии роста или уменьшении его амплитуды отражает снижение проявлений страха и тревожности, связанное с уменьшением возбудимости коры мозга и проявляющееся снижением скорости передачи сигнала в нервной цепи АСО. В настоящей работе на фоне курсового приема ЭЛФ и после его отмены мы выявили стойкое возрастание латентности немодулированного АСО у «тревожных» крыс и латентности модулированного АСО у «нетревожных» животных. Приведенные данные согласуются с заключением о снижении уровня сенсомоторной реактивности (эмоциональности) под влиянием длительного потребления ЭЛФ и подтверждают сделанный на основании анализа динамики амплитуды АСО вывод о наличии у препарата анксиолитического и седативного действия.

В контексте приведенных рассуждений выявленная в нашей работе у контрольных «нетревожных» животных тенденция к снижению А1 в совокупности с тенденцией к увеличению М1 на фоне роста уровня тревожности, определяемого по шкале для оценки тревожно-фобических состояний, может отражать развитие у них адаптивного ответа, направленного на снижение эмоциональности, то есть на успокоение животных.

Известно, что срыв предстимульного торможения в акустическом стартл-рефлексе, которое, как сказано выше, характеризует состояние сенсомоторного входа, может быть вызван нарушением целого ряда нейрохимических механизмов, например, гиперактивацией дофаминергических систем, недостаточностью глутаматергической системы, гиперактивацией серотонинергической системы, а усиление ГАМК-ергических стриато-паллидарных влияний приводит к снятию эффекта снижения ПСТ АСО [22, 30]. Эти нейромедиаторные системы также вовлечены в генез тревожных состояний [31]. Обнаруженное в нашем исследовании снижение величины ПСТ у «нетревожных» крыс, принимавших ЭЛФ в течение месяца и демонстрировавших увеличение ситуационной тревожности, может отражать особенности реактивности указанных систем у животных данной подгруппы в условиях действия препарата. Выявленное у «нетревожных» крыс снижение ПСТ в условиях курсового применения ЭЛФ свидетельствует о возможности

возникновения негативных последствий его длительного потребления у некоторых особей в популяции. Полученные данные ставят вопрос о необходимости специального изучения механизмов действия ЭЛФ с учетом особенностей эмоционального статуса индивидуума.

Таким образом, курсовое применение ЭЛФ оказывает различное влияние на психофизиологические показатели сенсомоторной реактивности, характеризующие эффективность и скорость передачи сигнала в нервной цепи АСО, у «тревожных» и «нетревожных» крыс. Однако по совокупности данных можно прийти к заключению о том, что в условиях курсового применения ЭЛФ снижает сенсомоторную реактивность (эмоциональность), то есть уменьшает проявления «акустической» тревоги у крыс, проявляя анксиолитическое и успокаивающее действие, при этом эффект более выражен у животных с исходно высоким тревожно-фобическим уровнем.

Данные о нормализующем влиянии курсового применения ЭЛФ на уровень «акустической» тревоги получены на модели повышенной тревожности у крыс как варианте нормы в популяции, что открывает перспективы применения препарата как регулятора уровня эмоциональности с обязательным учетом особенностей психоэмоционального статуса индивидуума.

### Список литературы

1. Изард К. Психология эмоций. К. Изард. СПб.: Питер, 2003; 464 с.
2. Немов Р.С. Общие основы психологии. М., 4-е изд.: Гуманит. изд. центр ВЛАДОС, 2003; Кн. 1: 688 с.
3. Davis M., Walker D.L., Miles L., Grillon C. Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology*. 2010; 35(1): 105-35.
4. Мосолов С.Н. Тревога и депрессия: проблемы диагностики и терапии. *Психофармакотерапия депрессии*. 2005; 4: 1-15.
5. Батаршев А.В. Базовые психологические свойства и самоопределение личности: Практическое руководство по психологической диагностике. СПб.: Речь; 2005; 44-9.
6. Аведисова А.С. Тревожные расстройства. В кн.: Александровский Ю.А. (ред.) Психические расстройства в общей медицинской практике и их лечение. М.: ГЕОТАР-МЕД; 2004; 66-73.
7. Kohn S.R., Asnis G.M. Aggression in Psychiatric disorders // In: Mattson M.P., editor. *Neurobiology of aggression: Understanding and preventing violence*. Humana Press, Inc; Totowa, 2003: 135-49.
8. Kong J.-M., Goh N.-K., Chia L.-S., Chia T.-F. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Pharmacol. Sin*. 2003;24 (1): 7-21.
9. Sarris J., McIntyre E., Camfield D.A. Plant-based medicines for anxiety disorders, part 2: a review of clinical studi-

es with supporting preclinical evidence. *CNS Drugs*. 2013; 27(4): 300-19. doi: 10.1007/s40263-013-0059-9.

10. Sankari S.L., Babu N.A., Rani V., Priyadharsini C., Masthan K.M. Flavonoids — Clinical effects and applications in dentistry: A review. *J. Pharm Bioallied Sci*. 2014; 6(Suppl 1): S26-S29. doi: 10.4103/0975-7406.137256.

11. Sarris J., McIntyre E., Camfield D.A. Plant-based medicines for anxiety disorders, Part 1: a review of preclinical studies. *CNS Drugs*. 2013; 27(3): 207-19. doi: 10.1007/s40263-013-0044-3.

12. Родина В.И., Крупина Н.А., Крыжановский Г.Н., Окнина Н.Б. Многопараметровый метод комплексной оценки тревожно-фобических состояний у крыс. *Журнал высшей нервной деятельности*. 1993; 43(5): 1006-17.

13. Родина В.И., Крупина Н.А., Крыжановский Г.Н. Новая естественная модель повышенной тревожности у крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1993; 116(8): 127-30.

14. Крупина Н.А., Орлова И.Н., Крыжановский Г.Н., Соловьев А.Д. Изучение сенсомоторной реактивности у крыс с исходно высоким тревожно-фобическим уровнем. *Журнал высшей нервной деятельности*. 1994; 44(6): 1097-105.

15. Davis M., Antoniadis E.A., Amaral D.G., Winslow J.T. Acoustic startle reflex in rhesus monkeys: a review. *Rev. Neurosci*. 2008; 19(2-3): 171-85.

16. Grillon C. Models and mechanisms of anxiety: evidence from startle studies. *Psychopharmacology* (Berl). 2008; 199(3): 421-37. doi: 10.1007/s00213-007-1019-1.

17. Bradford D.E., Magruder K.P., Korhumel R.A., Curtin, J.J. Using the threat probability task to assess anxiety and fear during uncertain and certain threat. *J. Vis. Exp*. 2014; (91), e51905, doi: 10.3791/51905.

18. Belzung C., Griebel G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav. Brain Res*. 2001; 125: 141-9.

19. Vogel H.G. (Ed.) *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*. 3rd Edition. Springer. 2008; 2118 p.

20. Лукьянова Л.Д., Германова Э.Л., Лыско А.И. Энерготропное, адаптогенное и антигипоксическое действие флавоноидов. *Вестник ПAMH*. 2007; 2:55-61.

21. Davis M. Neurochemical modulation of sensory-motor reactivity: acoustic and tactile startle reflexes. *Neurosci. Biobehav. Rev*. 1980; 4(3): 241-63.

22. Geyer M.A. The family of sensorimotor gating disorders: comorbidities or diagnostic overlaps? *Neurotox. Res*. 2006; 10(3-4): 211-20.

23. Li L., Du Y., Li N., Wu X., Wu Y. Top-down modulation of prepulse inhibition of the startle reflex in humans and rats. *Neurosci. Biobehav. Rev*. 2009; 33(8): 1157-67.

24. Крупина Н.А., Орлова И.Н., Крыжановский Г.Н. Сенсомоторная реактивность (по акустическому стартл-ответу) у крыс с экспериментальным депрессивным синдромом. *Журнал высшей нервной деятельности*. 2001; 51(1): 89-97.

25. Пшенникова М.Г. Устойчивость к повреждающим воздействиям и защитные эффекты адаптации у животных разных генетических линий. *Патогенез*. 2012; 10(1):20-6.

26. Перцов С.С., Коплик Е.В., Воложин А.И., Судачков К.В. Антистрессорное действие биологически активной добавки «душевный чай. Успокоительный». *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2007; 4:13-15.

27. Хоничева Н.М., Чабак-Гарбач Р., Крупина Н.А. Поведенческие последствия изоляции в раннем онтогенезе у крыс: селективность тревожных состояний. *Журнал высшей нервной деятельности*. 2002; 52(6): 743-9.

28. Березин Ф.Б., Мирошников М.П., Рожанец Р.В. Методика многостороннего исследования личности. М: Медицина, 1976; 176 с.

29. Huffman R.F., Henson O.W. The descending auditory pathway and acousticomotor systems: connections with the inferior colliculus. *Brain Res. Rev*. 1990; 15(3): 295-324.

30. Swerdlow N.R., Caine S.B., Braff D.L., Geyer M.A. The neural substrates of sensorimotor gating of the startle reflex: a review of recent findings and their implications. *J. Psychopharmacol*. 1992; 6: 176-90.

31. Johnson M.R., Lydiard R.B. The neurobiology of anxiety disorders. *Psychiatr. Clin. North. Am*. 1995; 18(4): 681-725.

## References

1. Izard K. Psychology of emotions. K. Izard. SPb.: Piter, 2003. — 464. (In Russian)

2. Nemov R.S. General foundations of psychology. 4th ed. — M.: Gumanit. izd. centr VLADOS, 2003. — Kn. 1: 688. (In Russian)

3. Davis M., Walker D.L., Miles L., Grillon C. Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology*. 2010; 35(1): 105 — 35.

4. Mosolov S.N. Anxiety and depression: problems of diagnosis and therapy. *Psihofarmakoterapija depressii*. 2005; 4: 1-15. (In Russian)

5. Batarshv A.V. Basic psychological characteristics of personality and self-determination: A practical guide to psychological diagnosis. A.V. Batarshv. SPb.: Rech'; 2005; 44-9. (In Russian)

6. Avedisova A.S. Anxiety Disorders. V kn.: Aleksandrovskij Ju.A. (red.) Mental disorders in general practice and their treatment. M.: GEOTAR-MED; 2004; 66-73. (In Russian)

7. Kohn S.R., Asnis G.M. Aggression in Psychiatric disorders. In: Mattson M.P., editor. Neurobiology of aggression: Understanding and preventing violence. Humana Press, Inc; Totowa, 2003;135-49.

8. Kong J.-M., Goh N.-K., Chia L.-S., Chia T.-F. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Pharmacol. Sin*. 2003; 24 (1): 7-21.

9. Sarris J., McIntyre E., Camfield D.A. Plant-based medicines for anxiety disorders, part 2: a review of clinical studies with supporting preclinical evidence // *CNS Drugs*. — 2013. — 27(4): 301 — 319. doi: 10.1007/s40263-013-0059-9.

10. Sankari S.L., Babu N.A., Rani V., Priyadharsini C., Masthan K.M. Flavonoids — Clinical effects and applications in dentistry: A review. *J. Pharm Bioallied Sci*. 2014; 6(Suppl 1): S26-S29. doi: 10.4103/0975-7406.137256.

11. Sarris J., McIntyre E., Camfield D.A. Plant-based medicines for anxiety disorders, Part I: a review of preclinical studies. *CNS Drugs*. 2013; 27(3):207-219. doi: 10.1007/s40263-013-0044-3.

12. Rodina V.I., Krupina N.A., Kryzhanovskij G.N., Oknina N.B. A multiparameter method for the complex evaluation of anxiety-phobic states in rats. *Zhurn. vyssh. nervn. dejat.* 1993; 43(5): 1006-17. (In Russian)

13. Rodina V.I., Krupina N.A., Kryzhanovskij G.N. A new natural model of elevated anxiety in rats. *Bjull. jeksper. biol. i med*. 1993; 116(8): 127-130. (In Russian)

14. Krupina N.A., Orlova I.N., Kryzhanovskij G.N., Solov'ev A.D. The sensorimotor reactivity of rats with an initially high anxiety-phobia level. *Zhurn. vyssh. nervn. dejat.* 1994; 44(6): 1097-105. (In Russian)
15. Davis M., Antoniadis E.A., Amaral D.G., Winslow J.T. Acoustic startle reflex in rhesus monkeys: a review. *Rev. Neurosci.* 2008;19(2-3): 171-85.
16. Grillon C. Models and mechanisms of anxiety: evidence from startle studies. *Psychopharmacology (Berl.)* 2008; 199(3): 421-37. doi: 10.1007/s00213-007-1019-1.
17. Bradford D.E., Magruder K.P., Korhumel R.A., Curtin, J.J. Using the threat probability task to assess anxiety and fear during uncertain and certain threat. *J. Vis. Exp.* 2014;(91), e51905, doi: 10.3791/51905.
18. Belzung C., Griebel G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav. Brain Res.* 2001; 125: 141-9.
19. Vogel H.G. (Ed.) *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*. 3<sup>rd</sup> Edition. — Springer, 2008; 2118 p.
20. Lukyanova L.D., Germanova Je.L., Lysko A.I. Energotropic, antihypoxic, and antioxidative effects of flavonoids. *Vestn. RAMN.* 2007; 2:55-61. (In Russian)
21. Davis M. Neurochemical modulation of sensory-motor reactivity: acoustic and tactile startle reflexes. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1980; 4(3): 241-63.
22. Geyer M.A. The family of sensorimotor gating disorders: comorbidities or diagnostic overlaps? *Neurotox. Res.* 2006; 10(3-4): 211-20.
23. Li L., Du Y., Li N., Wu X., Wu Y. Top-down modulation of prepulse inhibition of the startle reflex in humans and rats. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2009;33(8): 1157-67.
24. Krupina N.A., Orlova I.N., Kryzhanovskij G.N. Sensorimotor reactivity (acoustic startle response) in rats with experimental depressive syndrome. *Zhurn. vyssh. nervn. dejat.* 2001;51(1): 89 — 97. (In Russian)
25. Pshennikova M.G. Resistance to damaging influences and the protective effects of adaptation in animals of different genetic lines. *Patogenez.* 2012;10(1): 20-6. (In Russian)
26. Pertsov S.S., Koplík E.V., Volozhin A.I., Suda-kov K.V. An antistress action of a biologically active additive «nervine tea». *Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja terapija.* 2007; 4:13-5. (In Russian)
27. Khonicheva N.M., Czabak-Garbacz R., Krupina N.A. Behavioral consequences of isolation in early ontogeny in rats: selectivity of anxiety conditions. *Zhurn. vyssh. nervn. dejat.* 2002; 52(6): 743-9. (In Russian)
28. Berezin F.B., Miroshnikov M.P., Rozhanec R.V. Technique of multilateral study of personality. M: Medicina, 1976; 176 s. (In Russian)
29. Huffman R.F., Henson O.W. The descending auditory pathway and acousticomotor systems: connections with the inferior colliculus. *Brain Res. Rev.* 1990; 15(3): 295-324.
30. Swerdlow N.R., Caine S.B., Braff D.L., Geyer M.A. The neural substrates of sensorimotor gating of the startle reflex: a review of recent findings and their implications. *J. Psychopharmacol.* 1992; 6: 176-90.
31. Johnson M.R., Lydiard R.B. The neurobiology of anxiety disorders. *Psychiatr. Clin. North. Am.* 1995, 18(4): 681-725.

Поступила 16.10.14

Received 16.10.14

#### Сведения об авторах:

Орлова Ирина Николаевна — ст. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы, канд. биол. наук  
 Лукьянова Людмила Дмитриевна — доктор биол. наук, проф., член-корреспондент РАН, зав. лаб. биоэнергетики и проблем гипоксии, e-mail: ldruk@mail.ru

Кирова Ю.И.

## Роль системы глутатиона в регуляции окислительно-восстановительного статуса коры головного мозга крыс при гипоксии

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

Проведен сравнительный анализ влияния разных режимов гипобарической гипоксии (14% O<sub>2</sub>, 10,5% O<sub>2</sub> и 8% O<sub>2</sub>, 1 час; 15-дневный курс) на параметры системы глутатиона, интенсивность процессов свободнорадикального и перекисного окисления в коре головного мозга (КГМ) крыс с различной генетически-детерминированной устойчивостью к острой гипоксии. В условиях нормоксии в КГМ низкоустойчивых (НУ) крыс базовое содержание окисленного глутатиона и гидроперекисных метаболитов было на 20% ниже в сравнении с высокоустойчивыми (ВУ). Базовая активность ферментов цикла глутатиона в КГМ НУ крыс — глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы — была на 30% ниже, чем у ВУ. Данные свидетельствуют о более эффективной антиоксидантной защите ткани КГМ НУ крыс в сравнении с ВУ животными. Фенотипические различия в окислительно-восстановительных свойствах ткани КГМ у двух фенотипов крыс сохраняются и при гипоксических воздействиях. Показано, что эффективность системы глутатиона в регуляции редокс-гомеостаза КГМ зависит как от тяжести и длительности гипоксического воздействия, так и от индивидуальной переносимости животными гипоксии, т.е. генетически детерминирована. В КГМ НУ крыс эта система сохраняет свои регуляторные свойства в более широком диапазоне сниженных значений pO<sub>2</sub> сравнительно с ВУ животными и при более длительном их применении. Благодаря этому, в КГМ НУ крыс (но не ВУ) предотвращается либо ослабляется активация свободнорадикальных процессов и развитие окислительного стресса при однократном и курсовом применении гипоксических воздействий. Все это делает принципиально важным выбор режимов гипоксического воздействия при терапевтическом применении преко кондиционирования. Оптимальными, по-видимому, следует считать такие гипоксические воздействия, которые не сопровождаются появлением признаков окислительного стресса.

**Ключевые слова:** гипобарическая гипоксия; крысы с высокой и низкой устойчивостью к острой гипоксии; неокортекс; антиоксидантная система глутатиона; перекисное окисление липидов

Kirova Yu.I.

## Role of the glutathione system in regulation of redox status in the rat cerebral cortex under hypoxia

Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia.

The study compared effects of different hypobaric hypoxia regimens (14% O<sub>2</sub>, 10.5% O<sub>2</sub>, and 8% O<sub>2</sub>; 1 hour; 15 days) on parameters of the glutathione system, intensity of free radical oxidation, and intensity of lipid peroxidation in cerebral cortex (CC) of rats with different, genetically predetermined resistance to acute hypoxia. In normoxia, baseline concentrations of oxidized glutathione ( $0.155 \pm 0.011$  nmol/mg protein) and hydroperoxide metabolites ( $50.4 \pm 2.62$  cumene hydroperoxide equivalents/g tissue) were 20% lower in CC of low-resistance (LR) rats than in high-resistance (HR) rats ( $0.191 \pm 0.013$  nmol/mg protein;  $63.0 \pm 3.46$  cumene hydroperoxide equivalents/g tissue, respectively). Baseline activities of the glutathione cycle enzymes, glutathione peroxidase ( $31.2 \pm 1.59$  nmol/min/mg protein) and glutathione reductase ( $28.5 \pm 1.49$  nmol/min/mg protein), were 30% lower in LR rat CC than in HR rat CC ( $47.0 \pm 2.41$ ;  $43.3 \pm 2.26$  nmol/min/mg protein, respectively). These data suggested more efficient antioxidant defense of CC tissue in LR rats than in HR rats. The phenotypic difference in CC tissue redox properties between two rat phenotypes remained in hypoxia. The efficiency of glutathione system in regulation of CC redox homeostasis was shown to depend on both severity and duration of hypoxic exposures and on individual tolerability of hypoxia, i.e., this efficiency was genetically predetermined. The glutathione system maintains its regulatory properties in a broader range of lowered pO<sub>2</sub> values and during longer hypoxic exposures in LR rat CC than in HR rat CC. For this reason, activation of free radical processes and development of oxidative stress induced by single or repeated hypoxic exposures are prevented or alleviated in LR rat CC but not in HR rat CC. The obtained data strongly justify the need for selection of hypoxic exposure regimens for therapeutic hypoxic preconditioning. Apparently the hypoxic exposures not associated with signs of oxidative stress should be considered optimum.

**Key words:** hypobaric hypoxia; rats with low and high resistance to acute hypoxia; cerebral cortex; glutathione antioxidant system; lipid peroxidation

Для корреспонденции: Кирова Юлия Игоревна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. биоэнергетики и проблем гипоксии ФГБНУ «НИИОПП», e-mail: bioenerg@mail.ru



Низкомолекулярный тиол глутатион ( $\gamma$ -глутамил-цистеинил-глицин; GSH) содержится в высоких концентрациях (1–10 мМ) в клетках всех аэробных организмов и, благодаря сульфгидрильной группе (SH-) цистеина и ее способности к окислительно-восстановительным модификациям, играет центральную роль в регуляции внутриклеточного редокс-гомеостаза, тиол-дисульфидного состояния и функциональной активности структурных, ферментативных и сигнальных белков клетки [1, 2].

Глутатион определяется во всех компартаментах клетки, проявляет собственную, не связанную с ферментами, антирадикальную и антипероксидную активность. Однако в полной мере антиоксидантная функция глутатиона реализуется системой глутатион-зависимых ферментов, включающей глутатионпероксидазу (ГПО), глутатионтрансферазу (ГТ) и глутатионредуктазу (ГР). ГПО восстанавливает  $H_2O_2$  и органические гидроперекиси, а ГТ — главным образом, гидрофобные гидропероксиды с образованием окисленного глутатиона (GSSG). Ревосстановление GSSG катализирует НАДФН-зависимый фермент ГР. Таким образом, функциональная активность антиоксидантной системы глутатиона лимитируется скоростью восстановления НАДФ в пентозофосфатном цикле окисления глюкозы. GSH, GSSG, ГПО и ГР являются элементами редокс-цикла глутатиона [3, 4]. Кроме ГПО, ГТ, ГР к основным ферментам метаболизма глутатиона относится глутаредоксин. Фермент поддерживает сульфгидрильный (тиоловый) гомеостаз клеток, используя GSH для восстановления в белках окисленных остатков цистеина (Cys-SOH, Cys-SO<sub>2</sub>H), внутри/межмолекулярных дисульфидных связей в белках и смешанных глутатион-белковых дисульфидах (PrSSG) [2].

В физиологических условиях система глутатион-зависимых ферментов обеспечивает эффективное поддержание внутриклеточного редокс-гомеостаза, сульфгидрильного статуса клеток и сохранение высокой цитозольной концентрации GSH.

В условиях тяжелых гипоксических/ишемических воздействий развивается дисфункция системы глутатиона: снижается содержание общего глутатиона, увеличивается уровень GSSG, окисленных и S-глутатионилированных белков (глутатион-белковых дисульфидов) [5]. Главными мишенями S-глутатионилирования (обратимой инактивации) являются тиоловые ферменты (протеинфосфатаза 2A, тирозинфосфатаза 1B, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа,  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназа, митохондриальный комплекс I) и редокс-чувствительные транскрипционные факторы (HIF-1, NF- $\kappa$ B) [2, 4]. С S-глутатионилированием связана аккумуляция неправильно свернутых или развернутых белков, а также активация апоптотических путей [6].

Однако очевидно и то, что гипоксия, в зависимости от тяжести и продолжительности воздействия, может оказывать противоположное влияние на редокс-статус клетки и вызывать либо активацию, либо ингибирование сигнальных тиоловых белков [7, 8]. В результате может наблюдаться как увеличение восстановленности в системе глутатиона (увеличение GSH, отношения GSH/GSSG, снижение генерации  $O_2^-$  и  $H_2O_2$ ), так и снижение GSH и отношения GSH/GSSG за счет увеличения количества окисленной формы — GSSG, которая считается маркером окислительного стресса [9–12]. Систематические сравнительные исследования активности глутатионовой системы при разных режимах гипоксии отсутствуют.

Ранее нами было показано, что по мере усиления тяжести гипоксического воздействия реактивность антиоксидантной системы клеток неокортекса меняется. При 10%  $O_2$  наблюдается активация и усиление защитных механизмов, ограничивающих инициацию свободнорадикального окисления. При 8%  $O_2$  развивается истощение отдельных наиболее уязвимых звеньев антиоксидантной системы неокортекса [13–16].

Существует и еще один очень важный аспект проблемы. Ранее нами было показано, что у животных с генетически детерминированной различной толерантностью к гипоксии различные режимы гипоксических воздействий неодинаково влияют на параметры системы глутатиона и сопряженные свободно-радикальные процессы [7, 13, 15]. В мировой литературе публикации по этому вопросу отсутствуют.

*Цель исследования*, которое посвящено сравнительное изучение воздействия разных режимов гипобарической гипоксии и их длительности на параметры редокс-цикла глутатиона в коре головного мозга (КГМ) крыс с разной исходной толерантностью к острой гипоксии.

## Методика

Работа проведена на белых беспородных крысах-самцах при соблюдении требований по использованию животных для экспериментальных исследований, утвержденные Российским национальным комитетом по биоэтике Российской Академии наук. Животных предварительно тестировали на устойчивость к острой гипобарической гипоксии (ОГБГ), моделируемой в барокамере [17].

Группу высокоустойчивых (ВУ) животных составили особи, сохраняющие жизнеспособность на критической высоте (11 500 м) в течение 10 мин и более. Группу низкоустойчивых (НУ) животных составили особи, признаки асфиксии у которых выявлялись в этих условиях в течение 1–3 мин [18]. Период между тестированием животных на устойчивость к ОГБГ и последующим воздействием разных режимов гипобарической гипоксии (ГБГ) составлял не менее 4 нед.

При проведении экспериментов применяли режимы ГБГ разной тяжести:

- 1) 526 торр (эквивалентно 14% O<sub>2</sub> во вдыхаемом воздухе или подъему на высоту 3000 м; ГБГ<sub>3000</sub>);
- 2) 380 торр (эквивалентно 10,5% O<sub>2</sub> во вдыхаемом воздухе или подъему на высоту 5000 м; ГБГ<sub>5000</sub>);
- 3) 290 торр (эквивалентно 8% O<sub>2</sub> во вдыхаемом воздухе или подъему на высоту 7000 м; ГБГ<sub>7000</sub>).

Одночасовые гипоксические воздействия разной тяжести проводились ежедневно на протяжении 15 сут. Контрольные крысы находились в барокамере при нормальном атмосферном давлении (21% O<sub>2</sub>).

Декапитацию животных и выделение материала для исследования (неокортекс) производили через 1 мин и 24 ч после 1, 3, 8 и 15 гипоксических воздействий.

Для оценки интенсивности свободнорадикального и перекисного окисления в ткани КГМ исследовали: содержание гидроперекисных соединений (ГП) [19], диеновых конъюгатов полиненасыщенных высших жирных кислот (ДК) [20], а также метаболитов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактивных продуктов; ТБК-РП) [21]. В КГМ определяли содержание общего, восстановленного и окисленного глутатиона (G, GSH, GSSG) [22]. Рассчитывали индекс окислительного стресса (IOS) — процент содержания GSSG в общем пуле глутатиона —  $IOS = 100 \times (2 \times GSSG / G)$  [23]. Определяли активность ферментов цикла глутатиона: глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионредуктазы (ГР) [24, 25].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «Statistica 6,0» с использованием U-критерия Манна-Уитни и t-критерия Стьюдента. Значимыми считали различия между группами при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В условиях нормоксии содержание G, GSH, отношение GSH/GSSG, IOS, а также содержание продуктов ПОЛ (ДК и ТБК-РП) в КГМ НУ и ВУ к острой гипоксии крыс существенно не отличались. Однако базовый уровень GSSG и ГП в КГМ ВУ крыс был на

20% выше, чем у НУ; активность ферментов глутатионового цикла ГПО и ГР в КГМ ВУ крыс была на 35% выше в сравнении с НУ крысами (таблица). Установленные различия свидетельствуют о более высокой свободнорадикальной активности в ткани КГМ ВУ крыс в нормоксических условиях и сдвиге редокс-равновесия в сторону большей окисленности сравнительно с НУ. Таким образом, работа системы глутатиона в КГМ НУ крыс в условиях нормоксии более отрегулирована и сбалансирована, что обеспечивает более эффективную антиоксидантную защиту ткани мозга.

Следует отметить, что более высокая активность ГПО в КГМ ВУ крыс может отражать лучшую оксигенацию мозга у этих животных сравнительно с НУ крысами. Действительно, согласно данным Merante и соавт., экспрессия цитоплазматической изоформы ГПО (ГПО1) кислородзависима. Ген ГПО1 содержит два O<sub>2</sub>-отвечающих элемента, которые активируют транскрипцию в ответ на увеличение в клетке O<sub>2</sub>-уровня [26]. Более высокая оксигенация КГМ ВУ крыс в нормоксических условиях, в свою очередь, может определять более высокий уровень окислительного метаболизма и свободнорадикальной активности в этой ткани и быть причиной более высокого в ней базового уровня GSSG и перекисных метаболитов. Известно, например, что H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> непрерывно продуцируется в физиологических условиях митохондриями, пероксисомами, оксидазами эндоплазматического ретикулума и поддерживается на низком уровне различными пероксидазами [4].

Разные режимы гипоксических воздействий приводили к неодинаковым изменениям параметров системы глутатиона и ПОЛ в КГМ НУ и ВУ крыс. Так в КГМ НУ крыс сразу (через 1 мин) после окончания наиболее щадящего однократного гипоксического воздействия (14% O<sub>2</sub>, 1 ч) наблюдалось снижение содержания GSSG на 45-50%, IOS на 50% (рис. 1А), двукратное увеличение отношения GSH/GSSG. Активность ферментов глутатионового цикла (ГПО, ГР), содержание гидроперекисей и

Таблица

Содержание компонентов пула глутатиона, гидроперекисей, продуктов ПОЛ и активность ферментов цикла глутатиона в КГМ НУ и ВУ крыс в условиях нормоксии

| КГМ | G                               | GSH                         | GSSG                                       | GSH/GSSG<br>G | IOS         | ГПО  | ГР                        | ГП                         | ДК                            | ТБК-РП     |
|-----|---------------------------------|-----------------------------|--|---------------|-------------|--|---------------------------|----------------------------|-------------------------------|------------|
|     | мкмоль/г ткани (нмоль/мг белка) |                             |  |               | %           | нмоль · мин <sup>-1</sup> · мг <sup>-1</sup> белка |                           | экв. СНР · г <sup>-1</sup> | нмоль · г <sup>-1</sup> ткани |            |
| НУ  | 2,74 ± 0,14<br>(54,8 ± 3,2)     | 2,42 ± 0,13<br>(48,4 ± 2,5) | 0,155 ± 0,011<br>(3,1 ± 0,14)              | 15,61 ± 0,94  | 11,3 ± 0,67 | 31,2 ± 1,59  | 28,5 ± 1,49               | 50,4 ± 2,62                | 22,9 ± 1,16                   | 251 ± 14,1 |
| ВУ  | 2,98 ± 0,18<br>(59,6 ± 3,5)     | 2,59 ± 0,16<br>(51,8 ± 2,7) | 0,191 ± 0,013 <sup>#</sup><br>(3,8 ± 0,19) | 13,56 ± 0,82  | 12,8 ± 0,75 | 47,0 ± 2,41 <sup>##</sup>                          | 43,3 ± 2,26 <sup>##</sup> | 63,0 ± 3,46 <sup>#</sup>   | 24,9 ± 1,26                   | 286 ± 16,4 |

Примечание. <sup>#</sup> — различия между фенотипами (P < 0,05); <sup>##</sup> — различия между фенотипами (P < 0,01)

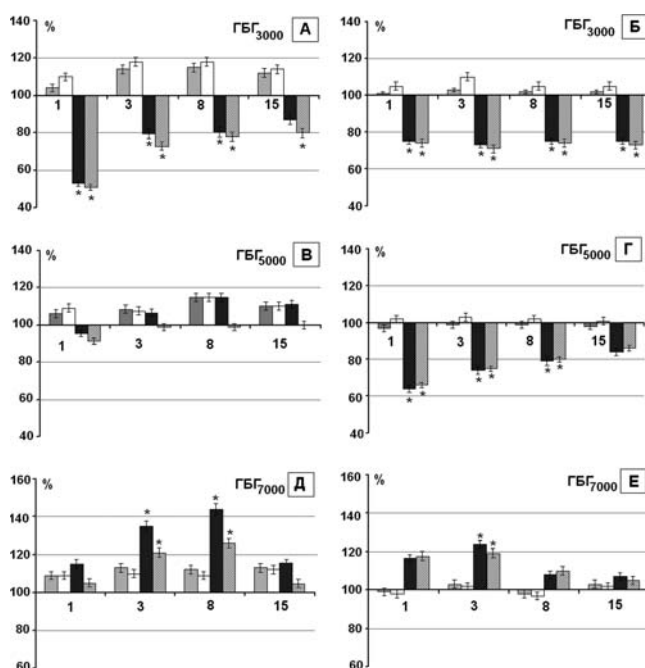
продуктов ПОЛ (ТБК-РП, ДК) значимо не менялись в этот период (рис. 2А, 3А).

При многократном (курсовом) применении данного гипоксического воздействия сходные по направленности изменениями GSSG сопровождали каждую очередную тренировку, но степень их выраженности в КГМ НУ крыс постепенно уменьшалась (рис. 1А). Все остальные исследованные параметры, характеризующие редокс-статус ткани (ферменты глутатионового цикла, гидроперекиси, продукты ПОЛ) значимо не менялись в КГМ НУ крыс на протяжении всего курса гипокситерапии (рис. 2А, 3А).

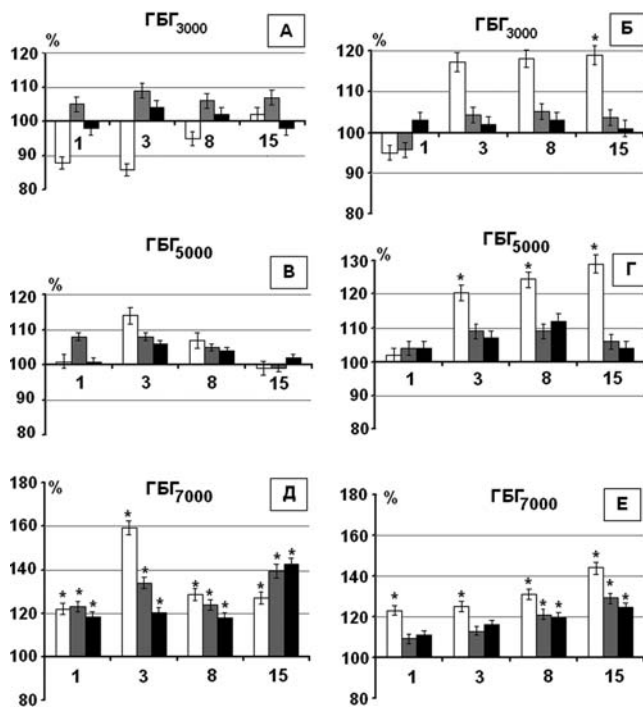
Таким образом, наиболее мягкий режим гипоксии, используемый в работе, индуцировал кратковременное снижение окисленности у НУ крыс без существенного изменения других параметров системы глутатиона и сопряженных свободнорадикальных процессов. Все это свидетельствует о сохранении в этих условиях способности системы глутатиона в КГМ НУ крыс к ответной реакции, характерной для фи-

зиологической нормы, направленной на снижение свободно-радикальной активности и сохранение восстановительного фонда клетки, что говорит о сбалансированности ее работы и способности регулировать окислительно-восстановительный гомеостаз клеток.

При увеличении тяжести гипоксии (10,5% O<sub>2</sub>, 1 ч) ответная реакция системы глутатиона в коре НУ крыс принципиально менялась. Так, сразу после окончания первого гипоксического воздействия и на протяжении трех последующих воздействий изменения параметров пула глутатиона вообще отсутствовали, в том числе и характерное для мягкой гипоксии снижение GSSG. Однако после 8-го—15-го гипоксического воздействия наблюдалось небольшое (10—15%; рис. 1В) увеличение уровня GSSG и снижение значений GSH/GSSG, коррелирующее со статистически не значимой активацией ГР и ГПО (рис. 3В). Уровень перекисных метаболитов и продуктов ПОЛ в КГМ НУ крыс, тем не менее, значимо не менялся в этих условиях (рис. 2В). Таким об-



**Рис. 1.** Динамика параметров пула глутатиона КГМ НУ и ВУ крыс при разных режимах гипоксических воздействий. А, В, Д — динамика параметров пула глутатиона КГМ НУ крыс в курсе ГБГ<sub>3000</sub> (А), ГБГ<sub>5000</sub> (В) и ГБГ<sub>7000</sub> (Д); Б, Г, Е — динамика параметров пула глутатиона КГМ ВУ крыс в курсе ГБГ<sub>3000</sub> (Б), ГБГ<sub>5000</sub> (Г) и ГБГ<sub>7000</sub> (Е). По оси абсцисс обозначено количество дней применения однократного гипоксического воздействия (1 мин реоксигенации). По оси ординат — % к контролю (100%). Серые столбики — содержание G (общий глутатион); белые столбики — содержание GSH (восстановленный глутатион); черные столбики — содержание GSSG (окисленный глутатион); заштрихованные столбики — IOS (индекс окислительного стресса); \* — данные отличаются от контроля (p<0,05).



**Рис. 2.** Динамика содержания ГП и продуктов ПОЛ в КГМ НУ и ВУ крыс при разных режимах гипоксических воздействий. А, В, Д — содержание ГП и продуктов ПОЛ в КГМ НУ крыс в курсе ГБГ<sub>3000</sub> (А), ГБГ<sub>5000</sub> (В) и ГБГ<sub>7000</sub> (Д); Б, Г, Е — содержание ГП и продуктов ПОЛ в КГМ ВУ крыс в курсе ГБГ<sub>3000</sub> (Б), ГБГ<sub>5000</sub> (Г), ГБГ<sub>7000</sub> (Е). По оси абсцисс обозначено количество дней применения однократного гипоксического воздействия (1 мин реоксигенации). По оси ординат — % к контролю (100%). Белые столбики — содержание ГП (гидроперекиси); серые столбики — содержание ДК (диеновые конъюгаты полиненасыщенных жирных кислот); черные столбики — содержание ТБК-РП (продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой); \* — данные отличаются от контроля (p<0,05).

разом, при гипоксии средней тяжести ( $10,5\% \text{ O}_2$ ) антиоксидантная функция системы глутатиона у НУ животных сохранялась, также как и способность поддерживать значения параметров пула глутатиона на уровне близком к норме. Однако потеря способности системы к увеличению восстановленности в ответ на 1-е гипоксическое воздействие, а также увеличение уровня окисленного глутатиона при курсовом применении гипоксии свидетельствует о постепенном снижении в этих условиях функциональной активности системы, направленной на поддержание восстановленности внутриклеточной среды.

Применение режима тяжелой гипоксии ( $8\% \text{ O}_2$ , 1 ч) сопровождалось сразу по окончании 1-го гипоксического воздействия не снижением, а тенденцией к увеличению уровня GSSG в КГМ НУ крыс (рис. 1Д). При этом сохранялось повышенное содержание GSH и отсутствовали изменения в отношении GSH/GSSG, а также IOS. Содержание ГП, продуктов ПОЛ и активность ГР увеличивались на  $20\%$  в 1-е сут. реоксигена-

ции (рис. 2Д, 3Д). При курсовом применении данного режима гипоксии содержание GSSG постепенно нарастало и достигало после 8-го применения гипоксии  $140\text{—}150\%$  (рис. 1Д). Несмотря на то, что содержание GSH оставалось несколько повышенным, отношение GSH/GSSG снижалось на  $25\%$ , а индекс IOS увеличивался на  $20\text{—}30\%$  (рис. 1Д). Воздействия тяжелой гипоксии сопровождалась увеличением уровня перекисных метаболитов и продуктов ПОЛ (рис. 2Д), которое имело двухфазную динамику с двумя максимумами: после 3-го (увеличение всех параметров на  $25\text{—}60\%$ ; рис. 2Д) и 15-го гипоксического воздействия (увеличение всех параметров на  $25\text{—}40\%$ ; рис. 2Д). Во всех случаях активность ферментов глутатионовой системы (ГПО, ГР) на протяжении 1-го—8-го гипоксических воздействий также была повышена на  $15\text{—}25\%$  (рис. 3Д). Таким образом, в условиях тяжелой гипоксии в КГМ НУ крыс развивался дисбаланс редокс-статуса клеток КГМ: гиперактивация прооксидантных систем [27] и функциональная недостаточность антиоксидантной системы глутатиона [28].

Тем не менее, несмотря на снижение регуляторной роли системы глутатиона при остром дефиците кислорода, в конце курсового применения гипоксических воздействий (15 сеансов) наступал период нормализации параметров пула глутатиона, который совпадал с завершением адаптации к гипоксии НУ животных и формированием у них нового повышенного уровня неспецифической резистентности организма [14—17]. Все это позволяет сделать вывод, что глутатионовая система принимает участие в процессах адаптации к гипоксии при разных режимах гипоксии, но эффективность ее регуляторного влияния в условиях острой гипоксии резко снижена.

Реакция системы глутатиона КГМ ВУ крыс на применение разных режимов гипоксических воздействий в значительной степени отличалась от НУ крыс.

Так, при действии наиболее щадящего режима гипоксии ( $14\% \text{ O}_2$ , 1 ч), несмотря на то, что сразу после 1-го гипоксического воздействия происходило снижение уровня GSSG на  $25\%$  (рис. 1Б), абсолютное содержание GSSG ( $3,0 \pm 0,17$  нмоль/мг белка) в КГМ ВУ крыс в раннем постгипоксическом периоде (через 1 мин после окончания гипоксического воздействия) было почти вдвое выше, чем у НУ крыс ( $1,6 \pm 0,09$  нмоль/мг белка;  $p < 0,01$ ). Следовательно, восстановительная способность системы глутатиона в КГМ ВУ крыс в этих условиях была менее эффективна в сравнении с НУ. В пользу этого вывода свидетельствует сниженная на  $15\text{—}20\%$  активность ГПО и ГР (рис. 3Б). Уровень гидроперекисей и продуктов ПОЛ в первые сутки после гипоксического воздействия значимо не менялся сравнительно с базовым, как и у НУ животных.

При многократном (курсовом) применении данного режима гипоксического воздействия ( $14\% \text{ O}_2$ , 1 ч) уро-

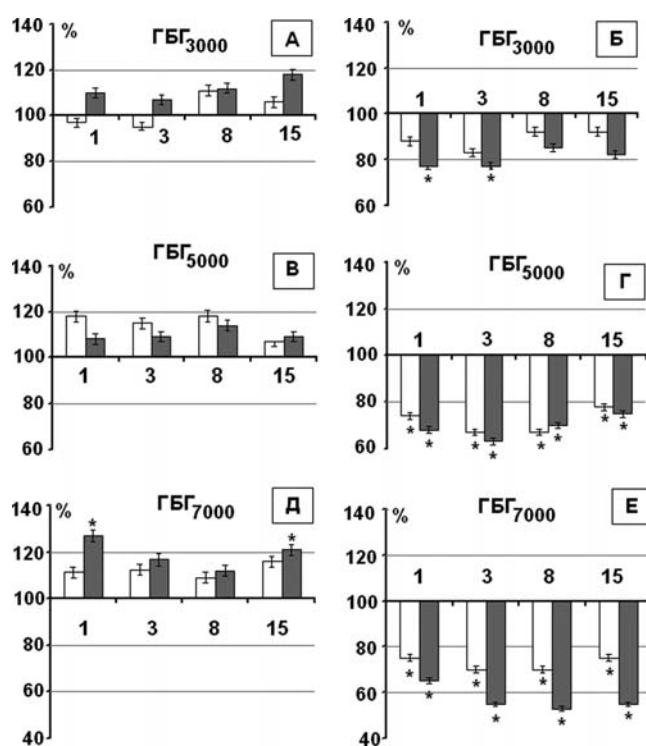


Рис. 3. Динамика активности ГПО и ГР в КГМ НУ и ВУ крыс при разных режимах гипоксических воздействий.

А, В, Д — динамика активности ГПО и ГР в КГМ НУ крыс в курсе ГБГ<sub>3000</sub> (А), ГБГ<sub>5000</sub> (В) и ГБГ<sub>7000</sub> (Д);

Б, Г, Е — динамика активности ГПО и ГР в КГМ ВУ крыс в курсе ГБГ<sub>3000</sub> (Б), ГБГ<sub>5000</sub> (Г), ГБГ<sub>7000</sub> (Е).

По оси абсцисс обозначено количество дней применения однокурсового гипоксического воздействия (1 мин реоксигенации). По оси ординат — % к контролю (100%). Белые столбики — активность ГПО (глутатионпероксидаза); серые столбики — активность ГР (глутатионредуктаза); \* — данные отличаются от контроля ( $p < 0,05$ ).

вень GSSG (рис. 1Б) и активность ГПО и ГР оставались сниженными на протяжении всего периода тренировок (рис. 3Б). Уровень ГП постепенно и значимо увеличивался, в отличие от НУ крыс, что свидетельствует о постепенной активации процессов свободнорадикального и перекисного окисления у КГМ ВУ крыс в процессе курсового применения гипоксии (рис. 2Б).

Таким образом, при действии щадящего режима гипоксии (14% O<sub>2</sub>) антиоксидантная активность системы глутатиона и ее восстановительная способность у ВУ крыс, начиная с 3-го гипоксического воздействия и до конца гипоксического курса была снижена сравнительно с НУ крысами.

Динамика исследуемых параметров цикла глутатиона в КГМ ВУ крыс в условиях гипоксии средней тяжести (10% O<sub>2</sub>, 1 ч) лишь частично была сходна с динамикой при 14% O<sub>2</sub>. Количественные изменения измеряемых параметров были выражены сильнее, чем в предыдущем случае. Сразу по окончании гипоксического воздействия снижение содержания GSSG и IOS в раннем постгипоксическом периоде составляло уже 30—35% (рис. 1Г), величина отношения GSH/GSSG увеличивалась на 60%. Значимые изменения содержания ГП и продуктов ПОЛ в 1-е сут отсутствовали (рис. 2Г), однако активность ГПО и ГР снижалась на 25—30% (рис. 3Г).

С увеличением числа гипоксических тренировок происходило постепенное увеличение уровня GSSG, IOS (рис. 1Г) и уменьшение отношения GSH/GSSG. Активность ферментов цикла глутатиона устойчиво снижалась: на 30—40% после 3—8-го воздействий и на 20—25% после 15-го (рис. 3Г); реактивация ГПО и ГР, характерная для щадящей гипоксии, отсутствовала. Параллельно со снижением активности ферментов цикла глутатиона наблюдали увеличение уровня ГП на 20—30% после 8—15-го воздействий (рис. 2Г). При этом значимые изменения содержания продуктов ПОЛ в КГМ ВУ крыс отсутствовали. Таким образом, при данном режиме гипоксического воздействия в КГМ ВУ крыс, в отличие от КГМ НУ животных, происходило ослабление регуляторного влияния системы глутатиона на внутриклеточный редокс-статус.

Еще большие нарушения в работе системы глутатиона в КГМ ВУ животных происходили в условиях тяжелой гипоксии (ГБГ, 8% O<sub>2</sub>, 1 ч). Так, сразу же после 1-го гипоксического воздействия происходило не снижение, а некоторое увеличение GSSG на 15% (рис. 1Е), значимое снижение активности ГПО и ГР на 25% и 35% соответственно (рис. 3Е), а также увеличение содержания ГП на 25% (рис. 2Е). Все эти данные свидетельствуют о развитии в КГМ ВУ крыс уже в раннем постгипоксическом периоде окислительного стресса и подавлении регуляторной функции системы глутатиона.

При действии тяжелой гипоксии увеличение уровня GSSG на 25% (рис. 1Е) и снижение отношения GSH/GSSG на 20% регистрировали в период первых трех гипоксических воздействий. Однако при продолжении тренинга их значения становились сходными с базовыми. Активность ГПО оставалась устойчиво сниженной на 25—30%, активность ГР продолжала снижаться с увеличением числа гипоксических воздействий (8% O<sub>2</sub>; 1 ч) — на 40—50% после 3—8-го эпизода гипоксии (рис. 3Е). Сравнение фенотипов показало, что на протяжении всего курса тяжелой гипоксии активность ГР в КГМ ВУ крыс была существенно (на 20—30%) ниже в сравнении с НУ. Снижение активности ферментов цикла глутатиона в ходе многократного применения тяжелой гипоксии сопровождалось увеличением содержания ГП и продуктов ПОЛ в КГМ ВУ крыс на 20—40% (рис. 2Е). Таким образом, как однократное, так и курсовое применение тяжелой гипоксии (8% O<sub>2</sub>) приводит в КГМ ВУ крыс к существенно более выраженному дисбалансу про- и антиоксидантных систем сравнительно с КГМ НУ крыс.

Проведенное исследование позволяет сделать несколько принципиально новых выводов. Впервые получены данные, свидетельствующие о базовых различиях в работе системы глутатиона КГМ крыс с различной исходной толерантностью к острой гипоксии, проявляющихся в нормоксических условиях. У НУ крыс эта система обеспечивает более эффективную антиоксидантную защиту ткани мозга, что подтверждается достоверно более низким содержанием окисленного глутатиона, гидроперекисных метаболитов и меньшей активностью ферментов цикла глутатиона в сравнении с ВУ.

Выявленные базовые различия в окислительно-восстановительных свойствах ткани КГМ у двух фенотипов животных сохраняются и при гипоксических воздействиях. Полученные в работе данные позволяют говорить о более сбалансированной работе глутатионовой системы КГМ НУ особей, обеспечивающей и в условиях гипоксии лучшую антиоксидантную защиту мозга сравнительно с ВУ. Действительно, и при однократном, и при курсовом применении наиболее щадящего гипоксического режима (14% O<sub>2</sub>) срочная реакция системы глутатиона КГМ НУ крыс была направлена на сохранение восстановительного фонда клетки и поддержание низкого уровня свободнорадикальной активности. В КГМ ВУ крыс качественно сходные по направленности изменения в содержании окисленного глутатиона количественно были выражены гораздо меньше, развивались на фоне уменьшения активности ферментов цикла глутатиона и нарастающего увеличения содержания гидроперекисных метаболитов. Таким образом, уже при действии наиболее щадящего режима гипоксии (14% O<sub>2</sub>) в КГМ ВУ крыс появля-

лись признаки окислительного стресса. Существенно более выраженные признаки дизрегуляции в системе глутатиона ВУ животных сравнительно с НУ проявлялись и в условиях гипоксии средней тяжести (10,5% O<sub>2</sub>) как при однократном, так и при курсовом ее применении. Наконец, в условиях тяжелой гипоксии (8% O<sub>2</sub>) регуляторная функция глутатионовой системы была резко снижена в КГМ обоих фенотипов животных, однако степень нарушения регуляторной функции у ВУ крыс была выражена гораздо сильнее.

Таким образом, очевидно, что функциональная активность системы глутатиона зависит как от тяжести и длительности гипоксического воздействия, так и от индивидуальной переносимости гипоксии, т.е. генетически детерминирована. В КГМ НУ крыс эта система сохраняет свои регуляторные свойства в более широком диапазоне сниженных значений рO<sub>2</sub> сравнительно с ВУ животными, а ее дизрегуляция развивается при более тяжелых формах гипоксии либо при более длительном их применении. Все это делает принципиально важным выбор режимов гипоксического воздействия при терапевтическом применении прекоondicionирования. Оптимальными, по-видимому, следует считать такие гипоксические воздействия, которые не сопровождаются появлением признаков окислительного стресса.

### Список литературы

1. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*. 2000; 62: 649-71.
2. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Саприн А.Н. Участие тио-, перокси- и глутаредоксинов в клеточных редокс-зависимых процессах. *Успехи биологической химии*. 2008; 48: 319-58.
3. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Глутатион ядра клетки и его функции. *Биомедицинская химия*. 2010; 56(6): 657-62.
4. Jones D.P. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008; 295: 849-68.
5. Mansfield K.D., Simon M.C., Keith B. Hypoxic reduction in cellular glutathione levels requires mitochondrial reactive oxygen species. *J Appl Physiol*. 2004; 97: 1358-66.
6. Uys J.D., Xiong, Y., Townsend D.M. Nitrosative stress-induced S-glutathionylation of protein disulfide isomerase. *Methods Enzymol*. 2011; 490: 321-32.
7. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И. Влияние гипоксического прекоondicionирования на свободнорадикальные процессы в тканях крыс с различной толерантностью к гипоксии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2011; 151(3): 263-8.
8. Кирова Ю.И. Влияние гипоксии на динамику содержания HIF-1 в коре головного мозга и формирование адаптации у крыс с различной резистентностью к гипоксии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2012; 3: 51-5.
9. Fan J., Cai H., Yang S., Van L., Tan W. Comparison between the effects of normoxia and hypoxia on antioxidant enzymes and glutathione redox state in ex vivo culture of CD34(+) cells. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2008; 151(2): 153-8.
10. Honchar O.O., Man'kov's'ka I.M. Glutathione system adaptation to acute stress in the heart of rats during different regimes of hypoxia training. *Ukr Biokhim Zh*. 2007; 79(3): 79-85.
11. Maiti P., Singh S.B., Sharma A.K., Muthuraju S., Banerjee P.K., Pavazhagan G. Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain. *Neurochem Int*. 2006; 49(8): 709-16.
12. Lin A.M., Chen C.F., Ho L.T. Neuroprotective effect of intermittent hypoxia on iron-induced oxidative injury in rat brain. *Exp Neurol*. 2002; 176(2): 328-35.
13. Лукьянова Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2011; 1: 2-18.
14. Кирова Ю.И., Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д. Фенотипические особенности экспрессии фактора, индуцированного гипоксией, и редокс-статус клеток неокортекса крыс на разных стадиях адаптации к гипоксии. *Фізіологічний журнал*. 2013; 59(6): 98-110.
15. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И., Сукоян Г.В. Новое о сигнальных механизмах адаптации к гипоксии и их роли в системной регуляции. *Патогенез*. 2011; 9(3): 4-14.
16. Лукьянова Л.Д., Сукоян Г.В., Кирова Ю.И. О роли провоспалительных факторов, оксида азота и некоторых показателей липидного обмена в формировании срочной адаптации к гипоксии и аккумуляции HIF-1. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2012; 154(11): 550-4.
17. Лукьянова Л.Д., Германова Э.Л., Копаладзе Р.А. Закономерности формирования резистентности организма при разных режимах гипоксического прекоondicionирования: роль гипоксического периода и реоксигенации. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2009; 147(4): 380-4.
18. Чернобаева Г.Н., Лукьянова Л.Д. Роль индивидуальной резистентности к гипоксическому фактору при поиске антигипоксантов и оценки эффективности их действия. В кн.: Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. М; 1989; 160-4.
19. Hermes-Lima M., Willmore W.G., Storey K.B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. *Free Radical Biology & Medicine*. 1995; 19(3): 271-80.
20. Esterbauer H., Striegl G., Puhl H., Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic. Res. Commun*. 1989; 6: 67-75.
21. Okawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem*. 1979; (95): 351-8.
22. Eyer P., Podhradsky D. Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman's reagent. *Anal. Biochem*. 1986; 153: 57-66.
23. Olsvik P.A., Kristensen T., Waagb R., Tollefsen K.-E., Rosseland B.O., Toften H. Effects of hypo- and hyperoxia on transcription levels of five stress genes and the glutathione system in liver of Atlantic cod *Gadus morhua*. *The Journal of Experimental Biology*. 2006; 209: 2893-901.
24. Ozdemir G., Ozden M., Maral H., Kuskay S., Cetinalp P., Tarkun I. Malondialdehyde, glutathione, glutathione peroxidase and homocysteine levels in type 2 diabetic patients with and without microalbuminuria. *Ann. Clin. Biochem*. 2005; (42); 99-104.
25. Dringen R., Gutterer J.M. Glutathione reductase from bovine brain. *Methods Enzymol*. 2002; 348: 281-8.
26. Merante F., Altamentova S.M., Mickle D.A.G., Weisel R.D., Thatcher B.J., Martin B.M. et al. The characterizati-

on and purification of a human transcription factor modulating the glutathione peroxidase gene in response to oxygen tension. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2002; 229: 73-83.

27. Abramov A.Y., Scorziello A., Duchon M.R. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *The Journal of Neuroscience*. 2007; 27(5):1129-38.

28. Gupte S.A., Arshad M., Viola S., Kaminski P.M., Ungvari Z., Rabbani G. et al. Hypoxia promotes relaxation of bovine coronary arteries through lowering cytosolic NADPH. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 290: H2228-H2238.

## References

1. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*. 2000; 62: 649-71.

2. Kalinina E.V., Chernov N.N., Saprin A.N. Involvement of thio-, peroxi-, and glutaredoxins in cellular redox-dependent processes. *Uspehi biologicheskoy himii*. 2008; 48: 319-58. (in Russian)

3. Kulinskij V.I., Kolesnichenko L.S. Nuclear glutathione and its functions. *Biomedicinskaja himija*. 2010; 56(6): 657-62. (in Russian)

4. Jones D.P. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008; 295: 849-68.

5. Mansfield K.D., Simon M.C., Keith B. Hypoxic reduction in cellular glutathione levels requires mitochondrial reactive oxygen species. *J Appl Physiol*. 2004; 97: 1358-66.

6. Uys J.D., Xiong, Y., Townsend D.M. Nitrosative stress-induced S-glutathionylation of protein disulfide isomerase. *Methods Enzymol*. 2011; 490: 321-32.

7. Lukyanova L.D., Kirova Yu.I. Effect of hypoxic preconditioning on free radical processes in tissues of rats with different resistance to hypoxia. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2011; 151(3): 292-6.

8. Kirova Yu.I. Effect of hypoxia on the dynamic content of HIF-1 in the cerebral cortex and the formation of adaptation in rats with different resistance to hypoxia. *Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja terapija*. 2012; 3: 51-5. (in Russian)

9. Fan J., Cai H., Yang S., Van L., Tan W. Comparison between the effects of normoxia and hypoxia on antioxidant enzymes and glutathione redox state in ex vivo culture of CD34(+) cells. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2008; 151(2): 153-8.

10. Honchar O.O., Man'kovs'ka I.M. Glutathione system adaptation to acute stress in the heart of rats during different regimes of hypoxia training. *Ukr Biokhim Zh*. 2007; 79(3): 79-85.

11. Maiti P., Singh S.B., Sharma A.K., Muthuraju S., Banerjee P.K., Ilavazhagan G. Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain. *Neurochem Int*. 2006; 49(8): 709-16.

12. Lin A.M., Chen C.F., Ho L.T. Neuroprotective effect of intermittent hypoxia on iron-induced oxidative injury in rat brain. *Exp Neurol*. 2002; 176(2): 328-35.

13. Lukyanova L.D. Modern problems of adaptation to hypoxia. Signaling mechanisms and their role in the system of regulation. *Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja terapija*. 2011; 1: 2-18. (in Russian)

14. Kirova Yu.I., Germanova E.L., Lukyanova L.D. Phenotypic features of hypoxia-inducible factor expression, and the redox status of the cells of the neocortex rats at different stages of adaptation to hypoxia. *Fiziologichnij zhurnal*. 2013; 59(6): 98-110. (in Russian)

15. Lukyanova L.D., Kirova Yu.I., Sukoyan G.V. New findings about signaling mechanisms of adaptation to hypoxia and their role in the systemic regulation. *Patogenez*. 2011; 9(3): 4-14. (in Russian)

16. Lukyanova L.D., Sukoyan G.V., Kirova Yu.I. Role of proinflammatory factors, nitric oxide, and some parameters of lipid metabolism in the development of immediate adaptation to hypoxia and HIF-1 accumulation. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2013; 154(5): 597-601.

17. Lukyanova L.D., Germanova E.L., Kopaladze R.A. Development of resistance of an organism under various conditions of hypoxic preconditioning: role of the hypoxic period and reoxygenation. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2009; 147(4): 400-4.

18. Chernobaeva G.N., Lukyanova L.D. The role of individual resistance to hypoxic factor when searching antihypoxants and evaluate the effectiveness of their actions. In: *Farmakologicheskaja korekcija gipoksicheskikh sostojanij*; Moscow; 1989; 160-4. (in Russian)

19. Hermes-Lima M., Willmore W.G., Storey K.B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. *Free Radical Biology & Medicine*. 1995; 19(3): 271-80.

20. Esterbauer H., Striegl G., Puhl H., Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic. Res. Commun*. 1989; 6: 67-75.

21. Okawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem*. 1979; (95): 351-8.

22. Eyer P., Podhradsky D. Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman's reagent. *Anal. Biochem*. 1986; 153: 57-66.

23. Olsvik P.A., Kristensen T., Waagb R., Tollefsen K.-E., Rosseland B.O., Toften H. Effects of hypo- and hyperoxia on transcription levels of five stress genes and the glutathione system in liver of Atlantic cod *Gadus morhua*. *The Journal of Experimental Biology*. 2006; 209: 2893-901.

24. Ozdemir G., Ozden M., Maral H., Kuskay S., Cetinalp P., Tarkun I. Malondialdehyde, glutathione, glutathione peroxidase and homocysteine levels in type 2 diabetic patients with and without microalbuminuria. *Ann. Clin. Biochem*. 2005; (42); 99-104.

25. Dringen R., Gutterer J.M. Glutathione reductase from bovine brain. *Methods Enzymol*. 2002; 348: 281-8.

26. Merante F., Altamentova S.M., Mickle D.A.G., Weisel R.D., Thatcher B.J., Martin B.M. et al. The characterization and purification of a human transcription factor modulating the glutathione peroxidase gene in response to oxygen tension. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2002; 229: 73-83.

27. Abramov A.Y., Scorziello A., Duchon M.R. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *The Journal of Neuroscience*. 2007; 27(5):1129-38.

28. Gupte S.A., Arshad M., Viola S., Kaminski P.M., Ungvari Z., Rabbani G. et al. Hypoxia promotes relaxation of bovine coronary arteries through lowering cytosolic NADPH. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 290: H2228-H2238.

Поступила 29.10.14

Received 19.10.14

Трегуб П.П.<sup>1,2</sup>, Куликов В.П.<sup>1,2</sup>, Степанова Л.А.<sup>1</sup>, Забродина А.С.<sup>1</sup>, Нагибаева М.Е.<sup>1</sup>

## **Роль аденозиновых А1-рецепторов и митохондриальных $K^+$ АТФ-каналов в механизме увеличения резистентности к острой гипоксии при сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии**

<sup>1</sup> — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, 656038, Алтайский край, Барнаул, пр. Ленина, 40

<sup>2</sup> — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 4

*Изучали роль мито $K^+$  АТФ-каналов и А1-рецепторов к аденозину в механизме увеличения резистентности к острой гипоксии после гипоксического, гиперкапнического и гиперкапнически-гипоксического прекондиционирования. Показано, что митохондриальные АТФ-зависимые калиевые каналы и А1-рецепторы к аденозину, являющиеся важнейшими механизмами прекондиционирования, имеют высокое значение в увеличении резистентности к острой гипоксии/ишемии при сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии. Однако, в отношении аденозиновых рецепторов, этот механизм реализуется без участия гиперкапнического компонента, который, по всей видимости, запускает нейропротекцию без активации аденозиновых А1-рецепторов.*

**Ключевые слова:** гипоксия, гиперкапния, гиперкапническая гипоксия, резистентность, калиевые каналы, аденозиновые рецепторы

Tregub P.P.<sup>1,2</sup>, Kulikov V.P.<sup>1,2</sup>, Stepanova L.A.<sup>1</sup>, Zabrodina A.S.<sup>1</sup>, Nagibaeva M.E.<sup>1</sup>

## **The role of adenosine A1 receptors and mitochondrial $K^+$ АТФ channels in the mechanism of increasing the resistance to acute hypoxia in the combined effects of hypoxia and hypercapnia**

<sup>1</sup> — Altay state Medical University / Barnaul, Lenin st., 40

<sup>2</sup> — Scientific-Research Institute of Physiology and Fundamental Medicine / 630117, Novosibirsk, Timakov st., 4

*We studied the role of the role of mito $K^+$  АТФ channels and А1-adenosine receptor in the mechanism of increasing the resistance to acute hypoxia after hypoxic, hypercapnic and hypercapnic-hypoxic preconditioning. It is shown that mitochondrial АТФ-sensitive potassium channels and А1-adenosine receptors, an important mechanism of preconditioning have a high value to increase the resistance to acute hypoxia / ischemia in the combined effect of hypoxia and hypercapnia. However, with regard to the adenosine receptor, this mechanism is realized without the participation hypercapnic component, which apparently starts neuroprotection without activation of the adenosine А1 receptors.*

**Key words:** hypoxia, hypercapnia hypercapnic hypoxia, resistance, potassium channels, adenosine receptors.

Известно, что гипоксические воздействия являются эффективным средством увеличения резистентности органов и тканей к дефициту кислорода [1, 2, 3]. Ранее в нашей лаборатории было показано, что эффективность сочетания гипоксии с гиперкапнией для увеличения толерантности к острой гипоксии/ишемии значительно выше, чем при их изолированном воздействии [4]. При этом протекторная эффективность изолированной гиперкапнии существен-

но превышает эффективность гипоксического воздействия, что свидетельствует о доминирующем влиянии гиперкапнии при их сочетании. Также, было обнаружено, что значительную роль в потенцировании гиперкапнией нейропротекторного эффекта гипоксии играет нейротрофический белок S-100 $\beta$ , фактор роста эндотелия сосудов VEGF и белок теплового шока HSP-70 [5]. Однако основные механизмы эффективности сочетанного воздействия гипоксии и гиперкапнии остаются малоизученными. Одними из наиболее вероятных механизмов увеличения резистентности к гипоксии/ишемии под влиянием гиперкапнически-гипоксического воздействия

**Для корреспонденции:** Трегуб Павел Павлович, аспирант каф. патофизиологии, ультразвуковой и функциональной диагностики ГБОУ ВПО «Алтайского государственного медицинского университета» Минздрава России.



может быть активация митохондриальных АТФ-зависимых калиевых каналов (миток<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналы) [6, 7] и А1-рецепторов к аденозину [8, 9, 10], являющихся важнейшими звеньями в феномене гипоксического прекодиционирования [11].

*Цель исследования* — оценка роли миток<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов и А1-рецепторов к аденозину в механизме потенцирования гиперкапнией протекторного эффекта гипоксии.

### Методика

Исследование проведено на 390 белых мышах-самцах линии С57BL/6, средней массой  $36 \pm 3$  г. Животные были рандомизированы с использованием программы SPSS 11.5 и разделены на 2 равные серии:

1-я — для изучения роли миток<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов (механизм 1);

2-я — для изучения роли аденозиновых А1-рецепторов (механизм 2).

Каждая серия включала 13 групп мышей по 15 животных в каждой: группа 1 (5-ND и DPCPX) — животные, получавшие блокатор; группа 2 (Diaz и 2-CADO) — животные, получавшие активатор; группа 3 (DMSO) — животные, получавшие растворитель препаратов диметилсульфоксид; группа контроля — интактная группа, получавшая инъекции физиологического раствора; группы животных, подвергавшихся воздействию нормобарической гипоксии (НГ) ( $O_2$  — 13%,  $CO_2$  — 0%; остальное —  $N_2$ ), пермиссивной гиперкапнии (ПГ) ( $O_2$  — 21%,  $CO_2$  — 7%; остальное —  $N_2$ ) или гиперкапнической гипоксии (ГГ) ( $O_2$  — 13%,  $CO_2$  — 7%; остальное —  $N_2$ ), сочетанную с применением блокатора или активатора, либо без них;

В качестве блокатора миток<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов использовали 1,2% раствор 5-гидроксидеканоата (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) в дозировке 40 мг/кг (растворитель — 0,9% NaCl), а блокатора аденозиновых А1-рецепторов — 0,1% раствор 1,3-дипропил-8-фенилксантина (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) в дозировке 4,5 мг/кг (растворитель — DMSO).

В качестве активатора миток<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов использовали 0,3% раствор диазоксида (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) в дозировке 10 мг/кг (растворитель — DMSO), а активатора аденозиновых А1-рецепторов — 0,1% раствор 2-хлораденозина (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) в дозировке 4 мг/кг (растворитель — DMSO). Инъекции препаратов производились внутривенно.

Животных всех опытных групп через 15 мин после введения препарата подвергали процедуре респираторного прекодиционирования в течение 30 мин

в специальной проточной камере по методике, описанной ранее [4]. Прекодиционирование проводили через 30 мин после введения активатора или блокатора миток<sup>+</sup><sub>АТФ</sub>-каналов и через 15 мин после введения активатора или блокатора А1-рецепторов к аденозину. Контрольные и опытные животные помещались в камеру при аналогичных условиях, но вместо газовой смеси, компрессором туда нагнетался атмосферный воздух.

Через 24 ч после процедуры прекодиционирования у всех животных оценивали резистентность к острой нормобарической гипоксии (ОНБГ) по методике Zhang et al. [13]. Для оценки резистентности использовался параметр «время жизни в условиях гипоксии» (ВЖУГ), который включал период от момента установления и поддержания концентрации  $O_2$  ~5% до наступления второго агонального вдоха.

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программного пакета Statistics for Windows v11.0. Значимость различий измеряемых параметров оценивали с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни для независимых выборок.

### Результаты и обсуждение

Известно, что появление агонального дыхания при воздействии острой нормобарической гипоксии свидетельствует о тяжелых нарушениях функций дыхательного центра и истощении компенсаторных возможностей организма [14]. Поэтому, параметр ВЖУГ свидетельствует о максимальной устойчивости организма к тяжелой гипоксии.

В 1-й серии при исследовании роли миток<sup>+</sup><sub>АТФ</sub> в механизме потенцирования гиперкапнией протекторного эффекта гипоксии получены следующие результаты (рис. 1): в группе мышей, тренированных ГГ, значимо повысилась толерантность к ОНБГ, при этом, блокатор каналов у группы с аналогичным воздействием снижал эффект до контрольных значений. Активатор каналов при сочетании с ГГ показал наибольшее увеличение параметра ВЖУГ, однако значимых различий с группой изолированного воздействия ГГ не было выявлено. Активатор калиевых каналов повышал толерантность к ОНБГ, но при сочетании с НГ и ПГ не оказывал влияния на резистентность мышей. Это может быть обусловлено невысокой активностью препарата в используемой дозировке, однократности введения и низкой интенсивностью тренировочного воздействия. При введении животным блокатора каналов ни в одной из групп не зафиксировано повышения ВЖУГ.

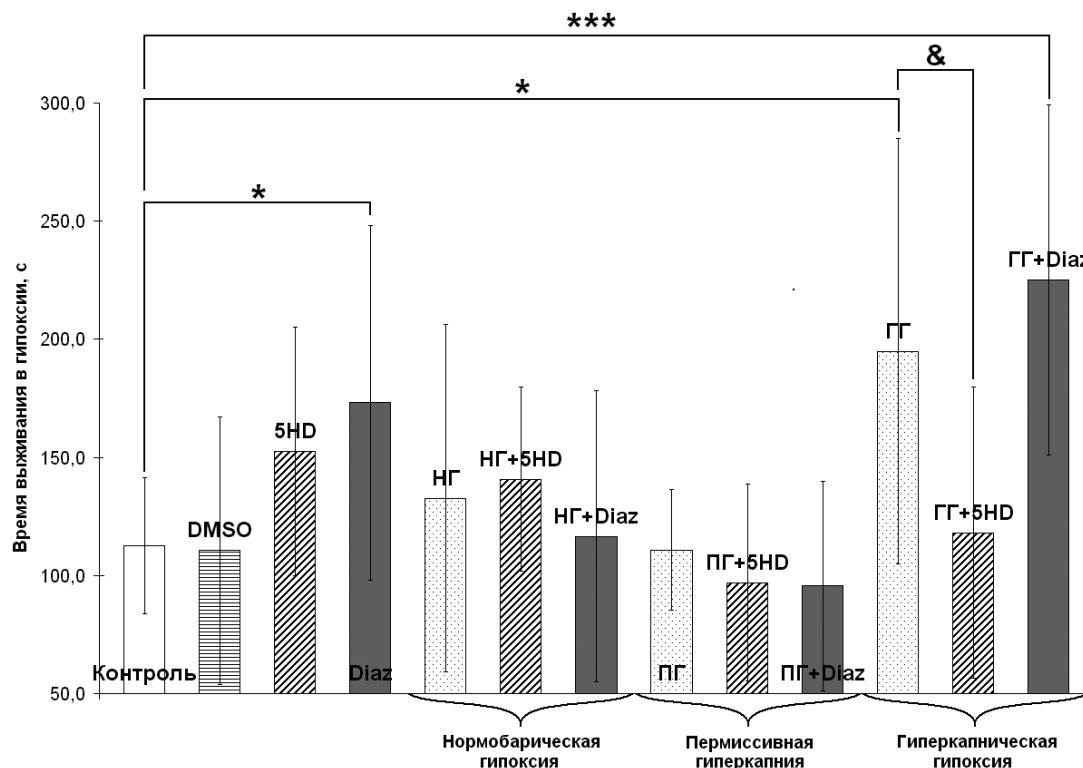


Рис. 1. Результаты 1-й серии исследования по изучению роли митоK<sup>+</sup><sub>ATФ</sub>-каналов. Данные представлены в виде среднего значения (M) ± стандартное отклонение (SD). 5-HD – 5-гидроксидеканоат; Diaz – диазоксид; DMSO – диметилсульфоксид; НГ – нормобарическая гипоксия; ПГ – перmissive гиперкапния; ГГ – гиперкапническая гипоксия; \* – отличия с группами контроля и DMSO (p<0,05); \*\*\* – отличия с группами контроля и DMSO (p<0,001); & – отличия с группой ГГ (p<0,05).

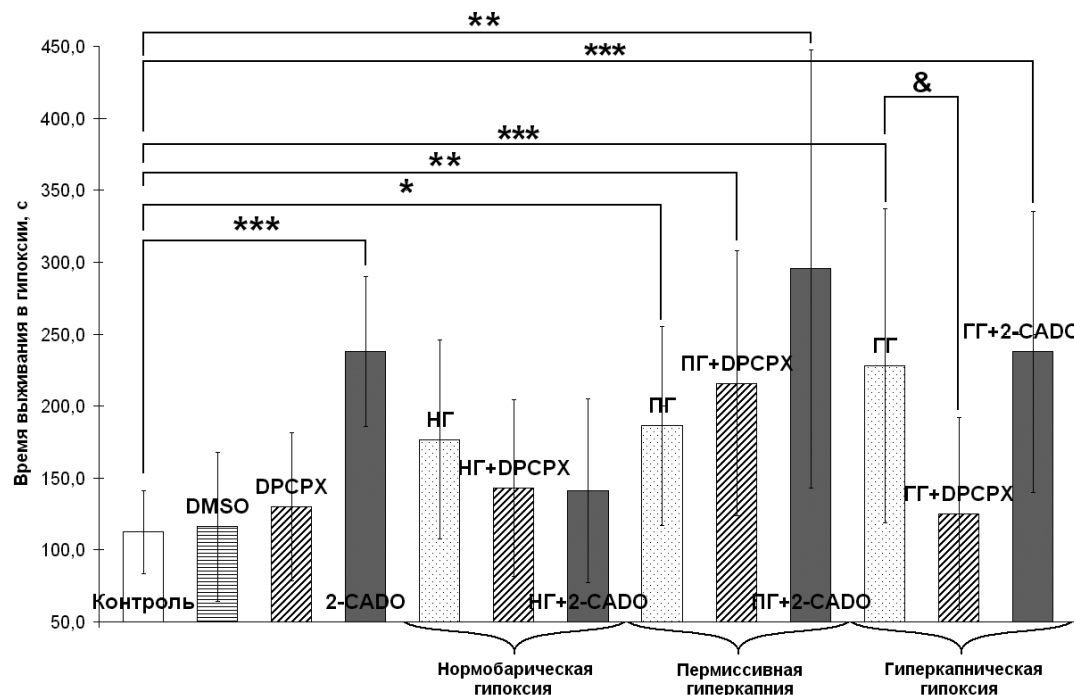


Рис. 2. Результаты 2-й серии исследования по изучению роли A1-аденозиновых рецепторов. Данные представлены в виде среднего значения (M) ± стандартное отклонение (SD). DPCPX – 1,3-дипропил-8-фенилксантин, 2-CADO – 2-хлораденозин, DMSO – диметилсульфоксид, 5-HD – 5-гидроксидеканоат, Diaz – диазоксид. \* – отличия с группой контроля и DMSO (p<0,05); \*\* – отличия с группой контроля и DMSO (p<0,01); \*\*\* – отличия с группой контроля и DMSO (p<0,001); & – отличия с группой ГГ (p<0,05).

Во 2-й серии при изучении роли аденозиновых А1-рецепторов, получены следующие результаты (рис. 2): у группы животных, подвергнутых воздействию ГГ, толерантность к ОНбГ увеличивалась, при этом, блокатор в сочетании с ГГ нивелировал положительный эффект, а активатор значимо не влиял на эффективность сочетанного воздействия гиперкапнии и гипоксии. В группе НГ не наблюдалось увеличения толерантности к ОНбГ, а сочетание с введением блокатора или активатора не влияло на резистентность животных к гипоксии. В группе, получавшей гиперкапническое воздействие, наблюдалось повышение резистентности к ОНбГ по сравнению с контролем, однако, введение блокатора не устраняло этот эффект, а применение активатора стимулировало прирост ВЖУГ, аналогично сочетанному воздействию гиперкапнии с гипоксией.

Таким образом, показана роль митохондриальных  $K^+$  АТФ-каналов и А1-рецепторов к аденозину в механизмах увеличения резистентности к острой гипоксии после гипоксического, гиперкапнического и гиперкапнически-гипоксического преко кондиционирования.

Считается, что защитный эффект преко кондиционирования является трехступенчатым и включает в себя последовательные триггерные и эффекторные механизмы [15, 16]. В целом, феномен преко кондиционирования определяют три ключевые составляющие: аденозин как основной триггер процесса, протеинкиназа С как ведущий внутриклеточный мессенджер и АТФ-зависимые калиевые каналы как конечный эффекторный белок [17]. Влияние на эти составляющие тем или иным способом может либо угнетать, либо стимулировать преко кондиционирование.

Митохондриальные АТФ-зависимые калиевые каналы осуществляют вход калия в митохондрии по электрохимическому потенциалу и имеют большое значение в нормальной физиологии клеток, регулируя объем митохондрий и продукцию активных форм кислорода [12]. Многие авторы сходятся во мнении, что активация митохондриальных  $K^+$  АТФ-каналов играет важную роль в механизме гипоксического и ишемического преко кондиционирования, благодаря стабилизации митохондриальных мембран, снижению метаболизма клетки и ингибированию апоптоза [7, 8, 9, 18].

В 1999 г. Li и Roth установили, что для стимуляции преко кондиционирования необходима активация аденозиновых А1-рецепторов, а использование их антагониста блокирует формирование ишемической толерантности [10]. При этом аденозиновый путь в механизме преко кондиционирования является самым коротким и реже повреждается, что позволяет считать его одним из базисных механизмов в формировании толерантности к ишемии/гипоксии [9, 19, 20].

Таким образом, проведенное исследование позволяет сделать заключение о том, что митохондриальные

АТФ-зависимые калиевые каналы и А1-рецепторы к аденозину, являющиеся важнейшими механизмами преко кондиционирования, имеют высокое значение в увеличении резистентности к острой гипоксии/ишемии при сочетанном воздействии гипоксии и гиперкапнии. Однако в отношении аденозиновых рецепторов этот механизм реализуется без участия гиперкапнического компонента, который, по всей видимости, запускает нейропротекцию без активации аденозиновых А1-рецепторов.

### Список литературы

1. Прерывистая нормобарическая гипокситерапия. Под редакцией Агаджаняна Н.А., Стрелкова Р.Б., Чижова А.Я.: М.: Медицина; 1997.
2. Лукьянова Л.Д., Германова Э.Л., Копаладзе Р.А. Закономерности формирования резистентности организма при разных режимах гипоксического преко кондиционирования: роль гипоксического периода и реоксигенации. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2009; 147(4): 380-4.
3. Shatilo V.B., Korkushko O.V., Ischuk V.A. et al. Effects of intermittent hypoxia training on exercise performance, hemodynamics, and ventilation in healthy senior men. *High Alt. Med. Biol.* 2008; 9: 43-52.
4. Куликов В.П., Трегуб П.П., Беспалов А.Г., Введенский А.Ю. Сравнительная эффективность гипоксии, гиперкапнии и гиперкапнической гипоксии в увеличении резистентности организма к острой гипоксии в эксперименте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2013; 3: 59-62.
5. Беспалов А.Г., Трегуб П.П., Куликов В.П. и др. Роль VEGF, HSP-70 и белка S-100B в механизмах потенцирования гиперкапнией нейропротекторного эффекта гипоксии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2014; 2: 45-57.
6. Lindauer U., Vogt J., Schuh-Hofer S. et al. Cerebrovascular vasodilation to extraluminal acidosis occurs via combined activation of ATP-sensitive and  $Ca^{2+}$ -activated potassium channels. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 2003; 10: 1227-38.
7. Murphy E. Primary and secondary signaling pathways in early preconditioning that converge on the mitochondria to produce cardioprotection. *Circulation Research*. 2004; 94: 7-16.
8. Blondeau N., Plamondon H., Richelme C. et al. KATP channel openers, adenosine agonists and epileptic preconditioning are stress signals inducing hippocampal neuroprotection. *Neuroscience*. 2000; 100: 465-74.
9. Heurteaux C., Lauritzen I., Widmann C., Lazdunski M. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, ATP-sensitive  $K^+$  channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995; 92: 4666-70.
10. Li B., Roth S. Retinal ischemic preconditioning in the rat: requirement for adenosine and repetitive induction. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999; 6: 1200-16.
11. Obrenovitch T.P. Molecular Physiology of Preconditioning-Induced Brain Tolerance to Ischemia. *Physiol. Rev.* 2008; 88(1): 211-47.
12. Inagaki N., Gonoi T., Clement J.P., et al. A family of sulfonylurea receptor determines the pharmacological properties of ATP-sensitive  $K^+$  channels. *Neuron*. 1996; 5: 1011-7.
13. Zhang S.X., Miller J.J., Gozal D., Wang Y. Whole-body hypoxic preconditioning protects mice against acute hypoxia by improving lung function. *J. Appl. Physiol.* 2004; 96:392-7.

14. St. John W.M. Medullary regions for neurogenesis of gasping: noeud vital or noeuds vitals. *J. Appl. Physiol.* 1996; 81: 1865-77.

15. Петрищев Н.Н. Сравнительная оценка эффективности локальной и дистантной ишемической адаптации миокарда у крыс. *Кардиология.* 2001; 41(10): 53-6.

16. Yellon D.M., Downey J.M. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev.* 2003; 83: 1113-51.

17. Liu Y., Sato T., O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation.* 1998; 97: 2463-9.

18. Garlid K.D., Paucek P., Yarov-Yarovoy V. et al. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ. Res.* 1997; 81: 1072-82.

19. Елисеев В.В., Полтавченко Г.М. Роль аденозина в регуляции физиологических функций организма: СПб: Наука; 2011.

20. Петрищев Н.Н., Шляхто Е.В., Галагудза М.М. Новые способы защиты миокарда от ишемического и реперфузионного повреждения: молекулярные механизмы и перспективы клинического применения. *Кардиология.* 2007; 5: 179-84.

## References

1. Intermittent normobaric hypoxic. Edited by Agadzhanjan N.A., Strelkov R. B., Chizhov A. Ja.: Moscow: Medicine; 1997. (in Russian)

2. Luk'janova L.D., Germanova Je.L., Kopaladze R.A. Laws of formation of resistance of the organism under different conditions of hypoxic preconditioning: the role of the hypoxic period and reoxygenation. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2009; 147(4): 380-4. (in Russian)

3. Shatilo V.B., Korkushko O.V., Ischuk V.A. et al. Effects of intermittent hypoxia training on exercise performance, hemodynamics, and ventilation in healthy senior men. *High Alt. Med. Biol.* 2008; 9: 43-52.

4. Kulikov V.P., Tregub P.P., Bepalov A.G., Vvedenskii A.J. Comparative efficacy of hypoxia, hypercapnia, hypoxia and hypercapnia in increasing the body's resistance to acute hypoxia in the experiment. *Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja terapija.* 2013; 3: 59-62. (in Russian)

5. Bepalov A.G., Tregub P.P., Kulikov V.P. et al. The role of VEGF, HSP-70 and protein S-100B potentiating mechanisms neuroprotective effect of hypoxia hypercapnia. *Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja terapija.* 2014; 2: 45-57. (in Russian)

6. Lindauer U., Vogt J., Schuh-Hofer S. et al. Cerebrovascular vasodilation to extraluminal acidosis occurs via combined

activation of ATP-sensitive and Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 2003; 10: 1227-38.

7. Murphy E. Primary and secondary signaling pathways in early preconditioning that converge on the mitochondria to produce cardioprotection. *Circulation Research.* 2004; 94: 7-16.

8. Blondeau N., Plamondon H., Richelme C. et al. KATP channel openers, adenosine agonists and epileptic preconditioning are stress signals inducing hippocampal neuroprotection. *Neuroscience.* 2000; 100: 465-74.

9. Heurteaux C., Lauritzen I., Widmann C., Lazdunski M. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92: 4666-70.

10. Li B., Roth S. Retinal ischemic preconditioning in the rat: requirement for adenosine and repetitive induction. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999; 6: 1200-16.

11. Obrenovitch T.P. Molecular Physiology of Preconditioning-Induced Brain Tolerance to Ischemia. *Physiol. Rev.* 2008; 88(1): 211-47.

12. Inagaki N., Gono T., Clement J.P., et al. A family of sulfonylurea receptor determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Neuron.* 1996; 5: 1011-7.

13. Zhang S.X., Miller J.J., Gozal D., Wang Y. Whole-body hypoxic preconditioning protects mice against acute hypoxia by improving lung function. *J. Appl. Physiol.* 2004; 96: 392-7.

14. St. John W.M. Medullary regions for neurogenesis of gasping: noeud vital or noeuds vitals. *J. Appl. Physiol.* 1996; 81: 1865-77.

15. Petrishhev N.N. Comparative evaluation of the effectiveness of local and distant ischemic myocardial adaptation in rats. *Kardiologija.* 2001; 41(10): 53-6. (in Russian)

16. Yellon D.M., Downey J.M. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev.* 2003; 83: 1113-51.

17. Liu Y., Sato T., O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation.* 1998; 97: 2463-9.

18. Garlid K.D., Paucek P., Yarov-Yarovoy V. et al. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ. Res.* 1997; 81: 1072-82.

19. Eliseev V.V., Poltavchenko G.M. The role of adenosine in the regulation of physiological functions: Saint Petersburg: Science; 2011. (in Russian)

20. Petrishhev N.N., Shljahto E.V., Galagudza M.M. New ways to protect the myocardium from ischemic and reperfusion injury: molecular mechanisms and clinical perspectives application. *Kardiologija.* 2007; 5: 179-84. (in Russian)

Поступила 10.09.14

Received 10.09.14

## Сведения об авторах:

Куликов Владимир Павлович, д.мед.н., проф., зав. каф. патофизиологии, ультразвуковой и функциональной диагностики ГБОУ ВПО «Алтайского государственного медицинского университета» Минздрава России

Степанова Любовь Александровна, аспирант каф. патофизиологии, ультразвуковой и функциональной диагностики ГБОУ ВПО «Алтайского государственного медицинского университета» Минздрава России

Забродина Алина Сергеевна, студентка 4 курса лечебного факультета ГБОУ ВПО «Алтайского государственного медицинского университета» Минздрава России

Нагибаева Мадина Ермековна, студентка 4 курса лечебного факультета ГБОУ ВПО «Алтайского государственного медицинского университета» Минздрава России

Силачев Д.Н.<sup>1</sup>, Манских В.Н.<sup>2</sup>, Гуляев М.В.<sup>3</sup>, Певзнер И.Б.<sup>1</sup>, Зорова Л.Д.<sup>4</sup>,  
Бабенко В.А.<sup>2</sup>, Плотников Е.Ю.<sup>1</sup>, Пирогов Ю.А.<sup>5</sup>, Зоров Д.Б.<sup>1</sup>

## **Ишемия головного мозга вызывает патологические изменения, сходные с наблюдаемыми при болезни Альцгеймера**

<sup>1</sup> — НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д.1, стр.40

<sup>2</sup> — Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, 119234, Москва, ГСП-1, Ленинские горы МГУ 1, стр. 73

<sup>3</sup> — Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119192, Ломоносовский просп., 31, корп. 5

<sup>4</sup> — Международный учебно-научный лазерный центр МГУ им. М.В. Ломоносова, 119234, Москва, ГСП-1, Ленинские горы МГУ 1, стр. 73

<sup>5</sup> — Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991, ГСП-1, Москва, Ленинские горы, Дом 1, стр. 2

*В работе изучено влияние ишемии/реперфузии бассейна средней мозговой артерии на развитие поздних нарушений когнитивной функции головного мозга у крыс. С использованием 8-рукавного радиального лабиринта было показано, что через 6 мес после перенесенной ишемии головного мозга происходит ухудшение рабочей памяти и снижение у животных способности к обучению. Обнаружено, что фокальная ишемия головного мозга приводит к накоплению через 7 мес. зрелого амилоидного пептида и гиперфосфорилированной формы тау-белка в ишемизированном полушарии и белка предшественника бета-амилоидного пептида в контрлатеральном полушарии. Таким образом, следствием экспериментального ишемического инсульта является комплекс патологических изменений, аналогичных наблюдаемым при болезни Альцгеймера у людей.*

**Ключевые слова:** ишемия головного мозга; болезнь Альцгеймера; деменция; синильные бляшки; тау-белок

Silachev D.N.<sup>1</sup>, Manskikh V.N.<sup>2</sup>, Gulyaev M.V.<sup>3</sup>, Pevzner I.B.<sup>1</sup>, Zorova L.D.<sup>4</sup>,  
Babenko V.A.<sup>2</sup>, Plotnikov E.Y.<sup>1</sup>, Pirogov Y.A.<sup>5</sup>, Zorov D.B.<sup>1</sup>

## **Pathological changes after brain ischemia are similar to those observed in Alzheimer disease**

<sup>1</sup> — Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow 119992, Russian Federation

<sup>2</sup> — Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow 119234, Russian Federation

<sup>3</sup> — Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow 119192, Russian Federation

<sup>4</sup> — International Laser Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow 119234, Russian Federation

<sup>5</sup> — Faculty of Physics Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russian Federation

*We studied the influence of ischemia/reperfusion of the middle cerebral artery in the rat's brain on the deferred violation of cognitive functions of the brain which are similar to main symptoms observed in the development of Alzheimer's disease. Using 8-hose radial labyrinth we demonstrated that 6 months after incidence of cerebral ischemia a significant impairment of working memory and a decrease in animals the ability to learn are developed. 7 months after focal cerebral ischemia we could observe the accumulation of a mature amyloid peptide and hyperphosphorylated form of the Tau protein in ipsilateral cerebral hemisphere and of the the beta-amyloid peptide precursor in the contralateral hemisphere. Thus, after an experimental stroke in the brain pathological changes occur, as those typical of Alzheimer's disease.*

**Key words:** brain ischemia; Alzheimer's disease; dementia; senile plaques; tau-protein

Ишемия головного мозга является основной причиной когнитивных нарушений и основным фактором риска развития деменции [1]. Распространенность деменции среди пациентов, перенесших ишемический инсульт через 3 мес., в 9 раз, а через 4 года в 4—12 раз выше, чем в контрольных группах [2].

**Для корреспонденции:** Силачев Денис Николаевич — к.биол.н., ст. научн. сотр. лаб. структуры и функции митохондрий, e-mail: silachevdn@genebee.msu.ru

Нарушения интеллекта и деменция, наблюдаемые после ишемических повреждений головного мозга, связаны с развитием атрофических процессов в мозге [3, 4] и имеют общие neuropathological признаки, схожие с болезнью Альцгеймера [5]. В отдаленные сроки после ишемии головного мозга обнаруживается накопление нейротоксических включений, аналогичных тем, которые считаются главными повреждающими факторами при болезни Альцгеймера. Например, Alz-50-иммунореактивные гранулы обнаружива-

ются в области ишемического повреждения мозга, а генетический фактор риска ApoE64 является общим для болезни Альцгеймера и инсульта [6]. В связи с этим патологические состояния, имеющие общие черты на уровне клинических проявлений и патогенеза (накопление аберрантных включений и т.д.) и приводящие к деменции, называют деменцией по типу болезни Альцгеймера.

*Цель работы* — изучение влияния ишемии/реперфузии головного мозга на развитие поздних нарушений когнитивных функций и роли накопления аберрантных белков в мозге крыс.

### Методика

Работа выполнена на самцах белых беспородных крыс массой 300—350 г. Животные содержались в виварии при свободном доступе к пище и воде и 12-часовом световом режиме. В работе соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества 2010/63/EU об использовании животных для экспериментальных исследований.

Животные были разделены на 2 группы:

- 1-я — ложнопериованные животные (контроль,  $n = 12$ );
- 2-я — крысы с экспериментальным инсультом (ишемия,  $n = 12$ ).

Животных перед операцией анестезировали хлоралгидратом (300 мг/кг, в/б). Ишемию воспроизводили односторонним внутрисосудистым перекрытием ветви средней мозговой артерии (СМА) нейлоновой нитью, покрытой силиконом [7]. Оклюзию проводили в течение 60 мин, после чего нить извлекали из сосуда, восстанавливая кровоснабжение в бассейне СМА. Во время и после операции температура тела животного поддерживалась на уровне  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  с помощью подогрева инфракрасной лампой. Ложнопериованные животные подвергались тем же процедурам, за исключением перерезки сосудов и введения нити.

Головной мозг всех экспериментальных животных исследовали с помощью магнитно-ядерной резонансной томографии (МРТ) через 7 мес. после операции, как описано ранее [8]. Все МРТ эксперименты были выполнены на приборе BioSpec 70/30 (Bruker, Germany) с индукцией магнитного поля 7 Тл и градиентной системой 105 мТл/м. Общее время сканирования составляло 4 мин 48 с, толщина среза 0,5 мм. Животных перед МРТ анестезировали хлоралгидратом и помещали в устройство позиционирования с системой стереотаксиса и терморегуляции.

### Оценка когнитивного дефицита

Оценку когнитивного дефицита проводили в открытом 8-рукавном радиальном лабиринте через 6 мес. после индукции ишемии головного мозга. В течение периода обучения животное помещали в лабиринт 1 раз в день, 5 раз в неделю. Для каждой крысы случайным образом на весь период обучения определяли пять подкрепляемых рукавов, в которых находилось по одному семени подсолнечника. Крысу размещали на центральной платформе и позволяли животному находиться в лабиринте до тех пор, пока она не найдет все 5 семян, или до окончания времени сеанса (10 мин). Вход в неподкрепляемый рукав лабиринта засчитывали как ошибку долговременной памяти, а повторное посещение подкрепляемого рукава в течение одного сеанса определяли как ошибку рабочей памяти. Животных обучали 4 нед. в течение 20 сеансов, подсчитывали среднее арифметическое количества ошибок за каждую неделю обучения.

### Гистохимическое окрашивание срезов мозга

По окончании тестирования в 8-рукавном лабиринте животных выводили из эксперимента введением повышенной дозы хлоралгидрата. По 3 крысы из каждой группы случайным образом отбирали для нейрогистологического исследования. Для нейрогистологического исследования экспериментальных животных под хлоралгидратным наркозом транскардиально перфузировали модифицированным фиксатором Беллессницкого—Лилли (смесь формалин — спирт — уксусная кислота в пропорции 2:7:1). После стандартной процедуры дегидратирования и заливки в парафин делали срезы толщиной 4 мкм и окрашивали тиофлавином S с целью выявления амилоидных фибрилл [9]. Количество включений, окрашенных тиофлавином S, подсчитывали на срезах в 5 полях зрения.

### Вестерн-блоттинг

Для количественного определения содержания белка предшественника бета-амилоидного пептида (APP) и гиперфосфорилированной формы тау-белка отбирали по 4 крысы из каждой группы случайным образом. Мозг быстро извлекали из черепной коробки, разделяли на полушария и гомогенизировали в лизирующем буфере. После этого образцы отбирали для дальнейшего проведения Вестерн-блоттинга по стандартной методике. Мембраны инкубировали с первичными антителами к APP и тау-белку, фосфорилированному по 205 треонину (abcam, Великобритания). После 3 отмывок мембраны инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Полосы детектировали с помощью хемилюминесцентного субстрата пероксидазы хрена

ECL (Enhanced chemiluminescence system, Amersham Pharmacia Biotech). Хемилюминесценция детектировалась на фотопленку Kodak (США). Изображение оцифровывали на сканере Epson и анализировали с помощью программы ImageJ 1.38 (NIH, США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы Statistica 6.0 («StatSoft», США). Нормальность распределения признака в выборке оценивали по  $W$  критерию Шапиро—Уилка. Для оценки статистической значимости различий в поведенческих тестах использовали  $U$  критерий Манна—Уитни. Для оценки статистической значимости различий в накоплении aberrантных белков использовали  $T$ -критерий Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Анализ числа входов в неподкрепляемые рукава не выявил достоверных отличий между группами. Однако, анализ числа повторных входов в подкрепляемые рукава лабиринта в течение одной попытки, характеризующих рабочую память, выявил статистически значимое снижение числа ошибок после 3-й недели обучения в контрольной группе (ложнооперированные животные). При этом ложнооперированные крысы, совершали в среднем  $0,8 \pm 0,2$  ошибки, тогда как животные, перенесшие ишемию головного мозга, совершали  $2 \pm 0,3$  ошибки (рис. 1). Таким образом, ишемия головного мозга в бассейне средней мозговой артерии приводит к ухудшению функции рабочей памяти, но не влияет на долговременную.

По окончании поведенческих экспериментов было проведено магнитно-резонансное и гистохимическое исследование головного мозга для выявления накопления тиофлавин-положительных включений в различных структурах головного мозга. Методом МРТ была выявлена тяжелая степень церебральной атрофии с образованием большой порэнцефалической кисты и с дегенерацией ипсилатеральной сенсомоторной коры и стриатума (рис. 2,А). Гистохимический анализ срезов головного мозга крыс, перенесших ишемию, показал избирательное накопление тиофлавин-положительных образований в ипсилатеральном поврежденном полушарии в стриатуме, в различных ядрах таламуса, а также в перифокальной зоне коры и в глиомезодермальном рубце через 7 мес после ишемии (рис. 2,В—Г). В то же время, в контралатеральном полушарии были выявлены только единичные образования, окрашиваемые тиофлавином S (рис. 2,Б). В коре ипсилатерального полушария в среднем насчитывалось  $116 \pm 6$  включений, а в стриатуме  $128 \pm 2$  включений, тогда как в контралатеральном полушарии  $12 \pm 0,5$  и  $7,1 \pm 0,1$  включений соответственно (рис. 2,Д). Таким образом, накопление тиофла-

вин-положительных включений является специфичным для поврежденного полушария и затрагивает различные отделы головного мозга

Нейрофибрилярные включения, состоящие из гиперфосфорилированного тау-белка, являются общей чертой многих нейродегенеративных заболеваний, в том числе, болезни Альцгеймера, синдрома Дауна, лобно-височной деменции и др. Мы измеряли содержание гиперфосфорилированной формы тау-белка в мозге через 7 мес. после ишемии. Было показано, что в ипсилатеральном полушарии увеличивается содержание гиперфосфорилированного тау-белка на 80% по сравнению с контралатеральным полушарием (рис. 3,А). Также мы обнаружили, что в контралатеральном полушарии увеличивается содержание белка предшественника бета-амилоида (рис. 3Б). Повышение экспрессии APP в контралатеральном полушарии может быть интерпретировано как компенсаторная реакция, направленная на повышение пластичности мозга, вызванная его травмой, так как известно, что APP и его производные отвечают за пластичность головного мозга [10]. Так ранее было показано, что при ипсилатеральном ишемическом повреждении префронтальной коры происходят реципрокные изменения, выражающиеся в виде повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера, увеличения количества измененных нейронов, нарушения транспорта и метаболизма глюкозы в астроцитах [11].

Механизмы прогрессирования когнитивных нарушений после инсульта еще недостаточно изучены, однако многие исследования указывают на возможность развития патологических изменений в мозге, подобных наблюдаемым при болезни Альцгеймера [5]. Наша работа также показала повышение уровня экспрессии и процессинга белка-предшественника амилоида, приводящее к накоплению в мозге нейротоксического бета-амилоидного пептида. Помимо этого,

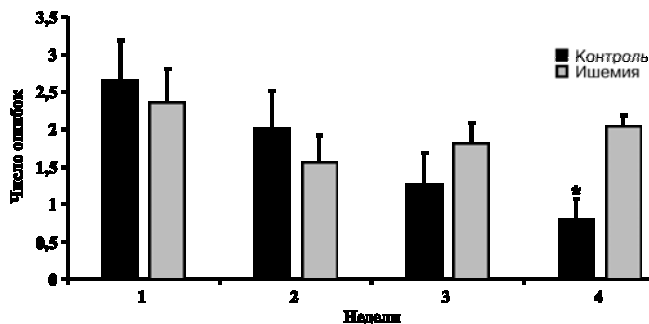
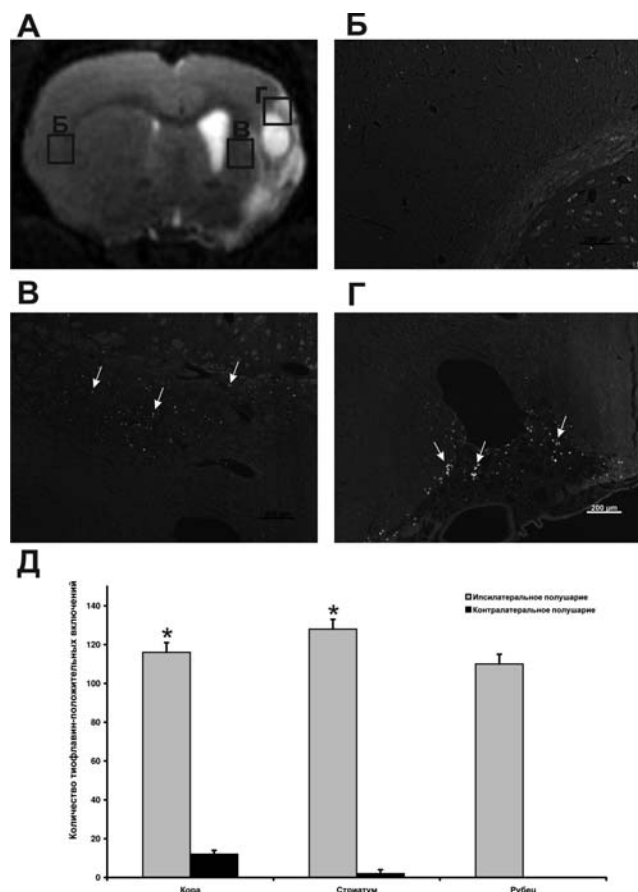
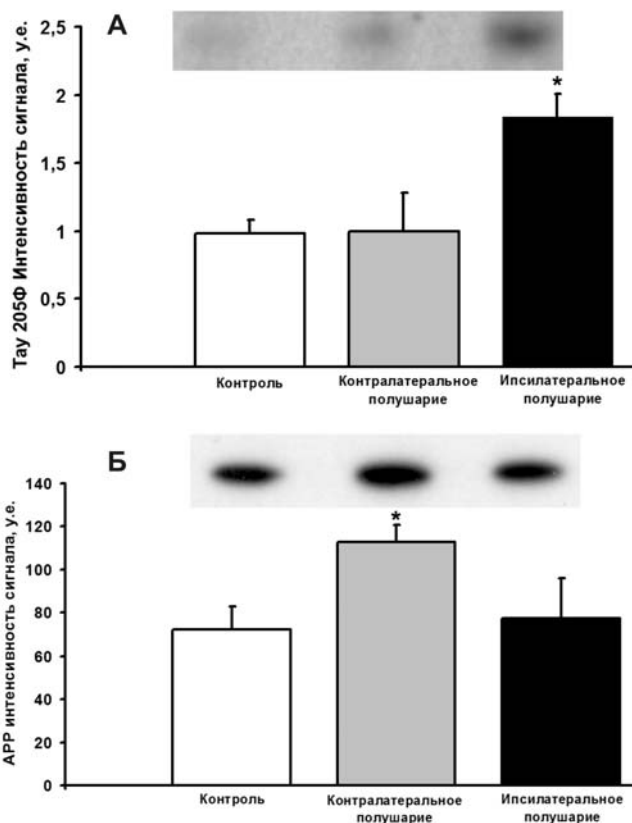


Рис. 1. Влияние ишемии головного мозга на состояние рабочей памяти у крыс через 6 мес. Животных обучали в открытом 8-рукавном радиальном лабиринте в течение 20 сеансов, 4 недели. Данные представлены как среднее арифметическое количества ошибок за 1 неделю обучения. \* —  $p < 0,01$  по сравнению с контрольной группой ( $U$ -тест).



**Рис. 2.** Накопление тиофлавин-положительных включений в головном мозге через 7 мес. после ишемии в бассейне средней мозговой артерии. Срезы окрашены тиофлавином S. А — репрезентативное МР-изображение головного мозга крысы, полученное методом T2-взвешенной МРТ через 7 мес. после ишемии. Квадратами и буквенными индексами обозначены области, взятые для гистохимической окраски тиофлавином S (Б–Г). Б — контралатеральное полушарие. В — область стриатума; Г — перифокальная зона и глиомезодермальный рубец в ипсилатеральном полушарии. Стрелками обозначены тиофлавин-положительные включения. Д — количественная оценка накопления тиофлавин-положительных включений. \* —  $p < 0,001$  по сравнению с контрольной группой (T-критерий Стьюдента).

в последнее время было обнаружено, что ишемия головного мозга приводит к развитию протеинопатий [12, 13]. В нейронах при этом происходит патологическое накопление промежуточных (олигомеры, протофибриллы) и конечных (фибриллярные и аморфные отложения) продуктов превращения различных белков в результате нарушения баланса между фосфорилированием/дефосфорилированием. Одним из характерных изменений подобного типа является накопление гиперфосфорилированного тау-белка, что также было показано в данной работе. Ранее уже высказывались предположения [14], что модель ишемии с по-



**Рис. 3.** Фокальная ишемия головного мозга вызывает увеличение содержания гиперфосфорилированной формы тау-белка (А) и белка предшественника бета-амиоида (APP) (Б) через 7 мес. после индукции. \* —  $p < 0,05$  (T-критерий Стьюдента) сравнение группы «Контралатеральное полушарие» с «Ипсилатеральное полушарие».

следующей реперфузией может использоваться для моделирования постинсультной деменции по типу болезни Альцгеймера с целью изучения патологических каскадов и способов фармакологической коррекции данной патологии. Действительно, на модели ишемии головного мозга при перекрытии средней мозговой артерии нами показано появление в мозге после ишемии патологических изменений, характерных для болезни Альцгеймера. Исходя из этого, можно предположить, что постишемическая деменция и болезнь Альцгеймера имеют сходный патогенез, приводящий к накоплению aberrantных белков и нарушению когнитивных функций мозга. Таким общим механизмом для этих двух видов патологии может являться, например, хроническое воспаление [15]. Представленные данные позволяют заключить, что ишемия вызывает хронические патологические изменения в ткани головного мозга, что соответственно требует поиска новых терапевтических подходов и схем лечения подобных заболеваний.



Работа поддержана грантами РФФИ №13-04-00484 (моделирование ишемии, оценка неврологического дефицита), РФФ №14-15-00147 (гистологические исследования) и Министерства образования и науки РФ согл. №14.604.21.0060 (исследование головного мозга методом МРТ).

### Список литературы

1. Pluta R. Is the ischemic blood-brain barrier insufficiency responsible for full-blown Alzheimer's disease? *Neurol. Res.* 2006; 28(6): 665-71.
2. Tatemichi T.K., Desmond D.W., Mayeux R., Paik M., Stern Y., Sano M. et al. Dementia after stroke: baseline frequency, risks, and clinical features in a hospitalized cohort. *Neurology.* 1992; 42(6): 1185-93.
3. Loeb C., Gandolfo C., Bino G. Intellectual impairment and cerebral lesions in multiple cerebral infarcts. A clinical-computed tomography study. *Stroke.* 1998; 19(5): 560-5.
4. Tatemichi T.K., Foulkes M.A., Mohr J.P., Hewitt J.R., Hier D.B., Price T.R. et al. Dementia in stroke survivors in the Stroke Data Bank cohort. Prevalence, incidence, risk factors, and computed tomographic findings. *Stroke.* 1990; 21(6): 858-66.
5. Pasquier F., Leys D. Why are stroke patients prone to develop dementia? *J. Neurol.* 1997; 244(3): 135-42.
6. Ikeda K., Akiyama H., Arai T., Kondo H., Haga C., Tsuchiya K. et al. Neurons containing Alz-50-immunoreactive granules around the cerebral infarction: evidence for the lysosomal degradation of altered tau in human brain? *Neurosci. Lett.* 2000; 284(3): 187-9.
7. Longa E.Z., Weinstein P.R., Carlson S., Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989; 20(1): 84-91.
8. Силачев Д.Н., Учеваткин А.А., Пирогов Ю.А., Зоров Д.Б., Исаев Н.К. Сравнение магнитно-резонансной томографии и трифенилтетразолиевого выявления повреждений головного мозга как методов исследования экспериментальной фокальной ишемии. *Бюл. экспер. биол. и мед.* 2009; 147(2): 223-6.
9. Bussiere T., Bard F., Barbour R., Grajeda H., Guido T., Khan K. et al. Morphological characterization of Thioflavin-S-positive amyloid plaques in transgenic Alzheimer mice and effect of passive Abeta immunotherapy on their clearance. *Am. J. Pathol.* 2004; 165(3): 987-95.
10. Nalivaeva N.N., Turner A.J. The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Lett.* 2013; 587(13): 2046-54.
11. Мухина И.В., Бугрова М.Л., Романова Г.А., Шакова Ф.М., Продиус П.А. Ультраструктурные изменения контралатерального участка перифокальной зоны локального ишемического очага, вызванного фотоиндуцированным тромбозом префронтальной коры мозга крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2010; (4): 43-8.
12. Aho L., Jolkkonen J., Alafuzoff I. Beta-amyloid aggregation in human brains with cerebrovascular lesions. *Stroke.* 2006; 37(12): 2940-5.
13. Wen Y., Yang S., Liu R., Brun-Zinkernagel A.M., Koulou P., Simpkins J.W. Transient cerebral ischemia induces aberrant neuronal cell cycle re-entry and Alzheimer's di-

sease-like tauopathy in female rats. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(21): 22684-92.

14. Simpkins J.W., Wen Y., Perez E., Yang S., Wang X. Role of nonfeminizing estrogens in brain protection from cerebral ischemia: an animal model of Alzheimer's disease neuropathology. *Ann. N Y Acad. Sci.* 2005; 1052: 233-42.

15. Krstic D., Madhusudan A., Doehner J., Vogel P., Notter T., Imhof C. et al. Systemic immune challenges trigger and drive Alzheimer-like neuropathology in mice. *J. Neuroinflammation.* 2012; 9:151. doi: 10.1186/1742-2094-9-151.

### References

1. Pluta R. Is the ischemic blood-brain barrier insufficiency responsible for full-blown Alzheimer's disease? *Neurol. Res.* 2006; 28(6): 665-671.
2. Tatemichi T.K., Desmond D.W., Mayeux R., Paik M., Stern Y., Sano M. et al. Dementia after stroke: baseline frequency, risks, and clinical features in a hospitalized cohort. *Neurology.* 1992; 42(6): 1185-93.
3. Loeb C., Gandolfo C., Bino G. Intellectual impairment and cerebral lesions in multiple cerebral infarcts. A clinical-computed tomography study. *Stroke.* 1998; 19(5): 560-5.
4. Tatemichi T.K., Foulkes M.A., Mohr J.P., Hewitt J.R., Hier D.B., Price T.R. et al. Dementia in stroke survivors in the Stroke Data Bank cohort. Prevalence, incidence, risk factors, and computed tomographic findings. *Stroke.* 1990; 21(6): 858-66.
5. Pasquier F., Leys D. Why are stroke patients prone to develop dementia? *J. Neurol.* 1997; 244(3): 135-42.
6. Ikeda K., Akiyama H., Arai T., Kondo H., Haga C., Tsuchiya K. et al. Neurons containing Alz-50-immunoreactive granules around the cerebral infarction: evidence for the lysosomal degradation of altered tau in human brain? *Neurosci. Lett.* 2000; 284(3): 187-9.
7. Longa E.Z., Weinstein P.R., Carlson S., Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989; 20(1): 84-91.
8. Silachev DN, Uchevatkin AA, Pirogov YA, Zorov DB, Isaev NK. Comparative evaluation of two methods for studies of experimental focal ischemia: magnetic resonance tomography and triphenyltetrazoleum detection of brain injuries. *Bull Exp Biol Med.* 2009;147(2):269-72 (in Russian).
9. Bussiere T., Bard F., Barbour R., Grajeda H., Guido T., Khan K. et al. Morphological characterization of Thioflavin-S-positive amyloid plaques in transgenic Alzheimer mice and effect of passive Abeta immunotherapy on their clearance. *Am. J. Pathol.* 2004; 165(3): 987-95.
10. Nalivaeva N.N., Turner A.J. The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Lett.* 2013; 587(13): 2046-54.
11. Mukhina I.V., Bygrova M.L., Romanova G.A., Shakhova F.M., Prodius P.A. Contralateral ultrastructural changes of the perifocal zone of the local ischemia caused by photoinduced thrombosis of the rat prefrontal brain cortex. *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* 2010; (4):43-8. (in Russian)
12. Aho L., Jolkkonen J., Alafuzoff I. Beta-amyloid aggregation in human brains with cerebrovascular lesions. *Stroke.* 2006; 37(12): 2940-5.
13. Wen Y., Yang S., Liu R., Brun-Zinkernagel A.M., Koulou P., Simpkins J.W. Transient cerebral ischemia induces aberrant neuronal cell cycle re-entry and Alzheimer's disease-like tauopathy in female rats. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(21): 22684-92.

14. Simpkins J.W., Wen Y., Perez E., Yang S., Wang X. Role of nonfeminizing estrogens in brain protection from cerebral ischemia: an animal model of Alzheimer's disease neuropathology. *Ann. N Y Acad. Sci.* 2005; 1052: 233-42.

15. Krstic D., Madhusudan A., Doehner J., Vogel P., Notter T., Imhof C. et al. Systemic immune challenges trigger and

drive Alzheimer-like neuropathology in mice. *J. Neuroinflammation.* 2012; 9:151. doi: 10.1186/1742-2094-9-151.

**Сведения об авторах:**

*Манских Василий Николаевич* — канд. мед. наук, докторант факультета биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова, e-mail: manskikh@mail.ru

*Гуляев Михаил Владимирович* — канд. физ.-мат. наук, науч. сотр., e-mail: Mihon-Epsilon@yandex.ru

*Певзнер Ирина Борисовна* — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории структуры и функции митохондрий, e-mail: irinapevzner@mail.ru

*Зорова Любава Дмитриевна* — канд. биол. наук., млад. науч. сотр., e-mail: lju\_2003@list.ru

*Бабенко Валентина Андреевна* — аспирант факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, e-mail: nucleus-90@yandex.ru

*Плотников Егор Юрьевич* — доктор биол. наук., вед. науч. сотр. лаборатории структуры и функции митохондрий, e-mail: plotnikov@mail.genebee.msu.ru

*Пирогов Юрий Андреевич* — доктор физ.-мат., проф.

*Зоров Дмитрий Борисович* — доктор биол. наук., проф., зав. лаб. структуры и функции митохондрий e-mail: zorov@genebee.msu.ru

Меркулов Ю.А.<sup>1,2</sup>, Пятков А.А.<sup>3</sup>, Меркулова Д.М.<sup>1,2</sup>

## **Особенности ремоделирования регуляции вегетативных функций человека при адаптации организма к экстремальным условиям в трудовой деятельности**

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

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

<sup>3</sup> — Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Московский научно-практический центр медицинской реабилитации, восстановительной и спортивной медицины» Департамента здравоохранения г.Москвы. 105120, Москва, ул. Земляной вал, 53

*В современном обществе профессиональная деятельность в условиях экстремальных факторов занимает все большее место. Особо следует отметить работу, связанную с ночными сменами, в рамках которой задействовано до 20% населения. В ряде случаев такая работа может вести к нарушению процессов адаптации организма и увеличивать риск развития заболеваний. Необходимость поиска критериев дизрегуляционных изменений в организме человека при адаптации к экстремальным условиям в трудовой деятельности является актуальной проблемой с точки зрения превентивного сохранения здоровья трудоспособного населения и обеспечения безопасности в условиях профессиональной деятельности. В работе предпринята попытка выявления начальных признаков дизрегуляции вегетативных функций на основе анализа вариабельности ритма сердца у машинистов локомотивов и врачей-дежурантов. Выявлено, что данные группы лиц с разным уровнем напряженности профессиональной деятельности могут являться моделью для наблюдения стадий дизрегуляционного процесса. Показано, что наиболее ранними маркерами ремоделирования вегетативной регуляции являются показатели спектрального анализа вариабельности ритма сердца, отражающие активность общей мощности регуляции (TP) и парасимпатического звена (HF).*

**Ключевые слова:** вегетативная нервная система, дизрегуляция, адаптация, ночные смены, машинисты локомотивов, вариабельность ритма сердца

Merkulov Y.A.<sup>1,2</sup>, Pyatkov A.A.<sup>3</sup>, Merkulova D.M.<sup>1,2</sup>

## **Peculiarity of autonomic functions regulation remodeling in human adaptation to extreme conditions in labor activities**

<sup>1</sup> — B.M. Geht Neurological Center at Non-governmental Healthcare Organization N.A. Semashko Central clinical hospital №2 OJSC «Russian Railways». 107150, Moscow, ul. Losinoostrovskaya, vladenie 43

<sup>2</sup> — Federal State Budgetary Scientific Institution «Scientific-Research Institute of General Pathology and Pathophysiology» 125315, Moscow, ul. Baltijskaya, dom 8

<sup>3</sup> — State-financed health institution «Moscow Scientific and Practical Center of Medical Rehabilitation, rehabilitation and sports medicine» of Moscow Department of Health Care. 105120, Moscow, ul. Zemlyanoy val, dom 53

*In modern society, professional activity in conditions of extreme factors occupies a growing place. Of particular note is the work related to night shifts involving up to 20% of the population. In some cases, this work may lead to a breach of the adaptation processes of the body and increase the risk of diseases. The necessity to search criteria of dysregulation changes in the human body during adaptation to extreme conditions in labor activities is the actual problem from the standpoint of preventive health care of the working population health and providing safety in professional activities conditions. In our work, we attempted to identify early signs of autonomic function's dysregulation by analyzing the heart rhythm variability in locomotive operators and doctors on duty. It was revealed that these groups of people with different levels of intensity of professional activities may be the model for observation of the stages of dysregulation process. It is also shown that the earliest markers of autonomic regulation remodeling are indicators of the spectral analysis of heart rhythm variability, reflecting the activity of the total power regulation (TP) and parasympathetic part (HF).*

**Key words:** autonomic nervous system, dysregulation, adaptation, night shifts, locomotive engineer, heart rhythm variability

**Для корреспонденции:** Меркулов Юрий Александрович, д.м.н., гл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы НИИ Общей патологии и патофизиологии, врач-невролог высшей категории Неврологического центра им. Б.М. Гехта ОАО «РЖД», E-mail: yurmerk@mail.ru

В современном урбанизированном и глобализированном обществе выполнение рабочих обязанностей у многих профессиональных категорий может быть сопряжено с целым рядом нестандартных обстоятельств, зачастую приближенных к экстремальным. К таким факторам можно отнести нарушение циркадных ритмов в связи с работой в ночное время суток, требующей поддержания длительной концентрации внимания на фоне высокой ответственности, связанной с сохранением человеческих жизней. В числе подобных профессиональных групп стандартно выделяют пилотов, машинистов локомотивов, диспетчеров, работников правоохранительных органов и медицинской отрасли.

Многолетними исследованиями было показано, что у машинистов локомотивов, в условиях готовности к экстренным действиям на фоне монотонии, повышенных требований к операторскому мышлению, высокой персональной ответственности имеются высокие риски развития сердечно-сосудистой патологии и ее осложнений [1—6].

Степень адаптации к напряженной работе зависит от многих факторов, однако механизмы такой адаптации являются неспецифическими и унифицированными и связаны с изменением регуляторной активности вегетативной нервной системы (ВНС). Была предложена многоуровневая многоконтурная модель регуляции вегетативных функций [7, 8], согласно которой, оптимальная схема заключается в превалировании инициативы сегментарных структур ВНС при малом вмешательстве центрального звена регуляции.

В условиях длительного влияния на организм человека патологических факторов окружающей среды или условно-патогенных (к которым можно отнести сложные условия трудовой деятельности) происходит перестройка всех функциональных систем. Фундаментальные основы такой перестройки отражены в процессах дизрегуляции и дизрегуляционной патологии [9]. Показано, что любые дизрегуляционные изменения в организме инициируются и катализируются перестройкой модели регуляции ВНС [4, 10].

Анализ variability ритма сердца (ВРС) — признанная методика исследования процессов регуляции физиологических функций, где система кровообращения рассматривается как индикатор адаптационных реакций всего организма, отражающий изменения вегетативного паттерна в ответ на высокие нагрузки [6, 7]. Рядом авторов показана существенная роль данного метода в оценке функционального состояния организма космонавтов [8, 11] и профессиональных спортсменов [12, 13]. Продемонстрированы особенности изменения вегетативной регуляции при различных патологических процессах и состоявшихся заболеваниях [5, 7, 10, 14—21]. Вместе с тем, одной

из фундаментальных задач поддержания здоровья здорового человека остается изучение перестройки ВНС в условиях напряженного профессионального труда — в ситуациях, когда требуется определение условной границы между нормой и патологией [4, 22].

*Цель исследования* — анализ особенностей обеспечения вегетативных функций и маркеров адаптационных реакций на модели практически здоровых людей с различной степенью напряженности труда, связанного с работой в ночное время суток.

### Методика

Всего было обследовано 152 человека (мужчины) в возрасте 32—55 лет. В их число вошли 41 машинист локомотива и 21 врача-дежуранта, группу контроля составили 26 человек служащие, чья работа не связана с ночными сменами, остальные были исключены на основании неполного соответствия критериям включения/исключения. Таким образом, в исследование, в качестве основных целевых групп, были включены практически здоровые лица с разной степенью напряженности труда на фоне выполнения профессиональных обязанностей в ночное время суток.

Основным методом оценки функционального состояния вегетативной нервной системы служил анализ ВРС. Исследование проводилось с помощью компьютерного оборудования «ВНС-микро» и программного обеспечения «Поли-Спектр» производства ООО «Нейрософт» (Россия, г.Иваново) с использованием поворотного стола. Стандартная методика исследования заключалась в последовательной записи электрокардиограммы: 5-минутная фоновая запись в состоянии расслабленного бодрствования и аналогичная запись после пассивного перевода исследуемого в ортостатическое положение с помощью поворотного стола. Наряду с анализом большинства общепринятых параметров временных и спектральных характеристик ВРС в фоновой и ортостатической пробах, наибольший акцент был сделан на интерпретацию следующих значений:

- TP — суммарная мощность спектра ВРС;
- VLF — самый низкочастотный компонент спектра ВРС;
- LF — низкочастотный компонент спектра ВРС;
- HF — высокочастотный компонент спектра ВРС;
- ИН — индекс напряжения регуляторных систем по Баевскому [7].

Статистическая обработка результатов проводилась при помощи компьютерной программы «Statistica» V 7.0 (StatSoft Inc., США). Были использованы параметрические и непараметрические методы описательной статистики с вычислением средних значений и среднего квадратичного отклонения, либо медианы,

верхнего и нижнего квартилей, для данных с нормальным и отличным от нормального распределением, соответственно. В первом случае для сравнения зависимых и независимых выборок применяли дисперсионный анализ и t-тест Стьюдента, во втором — ранговые критерии Вилкоксона, Манна—Уитни и Краскела—Уоллиса.

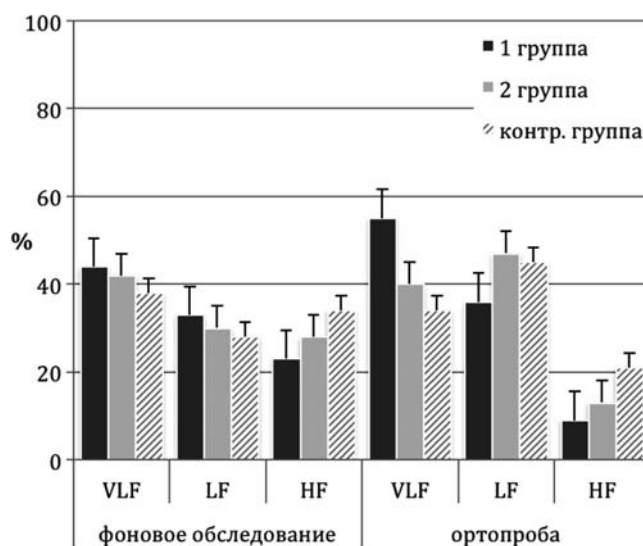
### Результаты и обсуждение

По результатам фоновой записи ВРС в группе машинистов показатели спектрального анализа имели меньшие значения, чем в группе контроля со статистически значимой разницей ( $p < 0,05$  при использовании критерия Манна—Уитни). Так, для ТР — показателя, отражающего вклад всех звеньев ВНС в мощность регуляции ритма сердца — среднее значение и стандартное отклонение, а также медиана и верхний и нижний квартили (25% и 75% значений) составили соответственно  $1714,29 \pm 1686,19$  и  $1297,0$  [707,0; 2012,0] против аналогичных параметров в группе контроля:  $3046,42 \pm 2467,41$  для средних и  $2333,0$  [1458,0; 3780,0] для медиано-квартильных отношений. Среднее значение и стандартное отклонение VLF (показателя, в целом отражающего вклад гуморального контура регуляции) в группе машинистов составили  $744,07 \pm 827,65$  против  $1178,15 \pm 641,50$  в группе контроля; медиана и интерквартильные значения:  $478,0$  [303,0; 890,0] и  $1236,5$  [562,0; 1685,0] соответственно. Среднее значение и стандартное отклонение LF (показателя, отражающего вклад симпатического звена регуляции) в группе машинистов находились на уровне  $551,95 \pm 513,56$  против  $845,08 \pm 546,40$  в группе контроля; медиана и квартильный размах имели значения  $403,0$  [199,0; 645,0] и  $587,0$  [391,0; 1132,0] соответственно. Среднее значение и стандартное отклонение HF (показателя, отражающего вклад парасимпатического звена регуляции) в группе машинистов составили  $394,56 \pm 630,91$  против  $1036,04 \pm 1889,40$  в группе контроля; медиана и интерквартильные значения:  $210,0$  [91,0; 352,0] и  $478,5$  [287,0; 1091,0] соответственно. Таким образом, и общая мощность спектра, и мощность каждого из компонентов спектра в группе машинистов имели меньшее значение, чем в группе контроля, а также ниже большинства общепринятых диапазонов нормативных показателей [23]. Обращало внимание, что наибольшее снижение показателей ВРС в группе машинистов в фоновой записи относилось к значениям общей мощности спектра ВРС (ТР) и высокочастотного компонента ВРС (HF). Полученные данные отражали снижение влияния всех компонентов ВНС на регуляцию ритма сердца, наибольшим образом

проявлявшееся снижением активности парасимпатической нервной системы.

Следует отметить, что, несмотря на абсолютное снижение всех спектральных показателей, внутридольное соотношение спектров в группе машинистов свидетельствовало о превалировании симпатогуморальной составляющей регуляции над парасимпатическим звеном и имело вид:  $44\%—33\%—23\%$  (VLF>LF>HF), что не вполне соответствовало оптимальной модели регуляции, так как из данных литературы известно примерно равное исходное соотношение по частотным спектрам ВРС в норме [23, 24]. Однако в нашем обследовании это не было подтверждено даже в контрольной группе, а зафиксированное соотношение равнялось  $38\%—28\%—34\%$  (VLF-LF-HF), что можно отразить следующим соотношением: VLF>HF>LF (рисунок). Полученные данные соответствуют опубликованным наблюдениям ряда авторов, в которых, результаты исследования спектров контрольных лиц также неоднородно распределены при фоновом обследовании [24].

На фоне проведения ортостатической пробы были выявлены тенденции к усугублению относительно оптимальной модели регуляции. В группе машинистов общая мощность спектра ВРС составляла  $2217,73 \pm 1328,96$  с медианой и квартильным размахом  $1954,0$  [1105,0; 3090,0]. Соотношение спектров (VLF-LF-HF) общей мощности имело структуру  $55\%—36\%—9\%$ . В группе контроля общая мощность спектра ВРС была на уровне  $3440,85 \pm 3532,70$  с медианой и квартильным размахом  $2594,5$  [1255,0; 4582,0]. Соотношение спектров (VLF-LF-HF) общей мощности имело структуру



Соотношение спектральных показателей мощности ВРС при фоновом исследовании и в ортостатической пробе в обследованных группах. Пояснения в тексте.

34%—45%—21%. Таким образом, в группе машинистов было отмечено статистически значимое увеличение общей мощности спектра ВРС (уровень  $p < 0,05$  по результатам сравнения зависимых показателей с использованием метода Вилкоксона). В группе контроля разница значений ТР в фоновой записи и ортопробе была статистически незначима ( $p > 0,05$ ). Обращало на себя внимание, что парадоксальное повышение общей мощности при ортопробе в группе машинистов было обусловлено не столько изменением доли спектра LF (-3%), сколько повышением доли спектра VLF (+11%), отражающего участие центрального контура регуляции. Также обращало на себя внимание, значительное падение доли компонента HF (-14%). В результате отношение отдельных спектров в группе машинистов при ортопробе имело вид:  $VLF > LF > HF$ . В группе контроля при проведении ортопробы значения ТР и соотношение спектров VLF и HF статистически значимо не отличались от таковых в фоновой записи ( $p > 0,05$ ). Лишь значение спектра LF в ортопробе имело большее значение по сравнению с фоновой записью, что отражало в целом нормальную перестройку долей спектров:  $LF > VLF > HF$  (рисунок).

Таким образом, по данным ортопробы, были выявлены признаки нарастания перестройки модели вегетативной регуляции, заключающиеся в недостаточности реактивности симпатического и парасимпатического звена ВНС, компенсированные избыточной активацией центрального контура регуляции. В фоновой записи среднее значение ИН и его стандартное отклонение равнялись  $160,66 \pm 99,78$  с медианой и квартильным размахом  $124,0 [81,0; 232,0]$ , в группе контроля —  $91,92 \pm 62,18$  и  $69,5 [50,0; 90,1]$  соответственно. Полученные данные в группе машинистов превышали допустимые нормальные значения; различия значений в изучаемых группах являлись статистически значимыми ( $p < 0,01$ ). При проведении ортопробы было отмечено нарастание ИН при уровне  $p < 0,01$ . Полученные значения ИН также подтверждали превалирование влияний центрального контура в регуляции ритма сердца в группе машинистов при недостаточности автономных (сегментарных) механизмов.

При сопоставлении с группой контроля значений аналогичных параметров ВРС фоновой записи, полученных в группе врачей-дежурантов было также отмечено наличие у последних тенденции к снижению. Так, среднее значение и стандартное отклонение ТР в группе врачей-дежурантов составляли  $2647,81 \pm 2506,00$ ; медиана и интерквартильные значения —  $1418,0 [891,0; 3970,0]$ . Среднее значение и стандартное отклонение VLF находились на уровне  $1113,43 \pm 1063,7$ ; медиана и квартильный раз-

мах имели значения  $650,0 [428,0; 1554,0]$ . Среднее значение и стандартное отклонение LF составляли  $808,05 \pm 708,23$ ; медиана и интерквартильные значения —  $429,0 [293,0; 1551,0]$ . Среднее значение и стандартное отклонение HF были зарегистрированы на уровне  $756,52 \pm 1167,42$ ; медиана и интерквартильные значения — на уровне  $271,0 [170,0; 635,0]$ . Выявленная тенденция сопровождалась выходом нижних квартилей большинства показателей за пределы нормативных данных, в особенности значение HF, что трактовалось, как и в группе машинистов, со снижением общей мощности вегетативной регуляции на ритм сердца, преимущественно за счет парасимпатической нервной системы. Вместе с тем, по всем анализируемым параметрам статистически значимой разницы между группой врачей-дежурантов и группой контроля выявлено не было.

В группе врачей-дежурантов в фоновой записи соотношение компонентов общей мощности спектра имело следующий вид: 42%—30%—28% (VLF-LF-HF). На фоне проведения ортостатической пробы общая мощность спектра (ТР) ВРС составляла  $2848,38 \pm 2891,98$  с медианой и квартильным размахом  $1366,0 [839,0; 5400,0]$ . Статистически значимого отличия между уровнем ТР в ортопробе и фоновой записи выявлено не было ( $p > 0,05$ ). Соотношение спектров (VLF-LF-HF) общей мощности имело структуру 40%—47%—13% ( $LF > VLF > HF$ ) и также в целом соответствовало оптимальной схеме реактивности ВНС и значениям группы контроля (рисунок). На фоне умеренного увеличения общей мощности спектра ВРС (+12%), внутриспектральная доля VLF оставалась практически неизменной (-2%), доля LF увеличилась пропорционально оптимальной физиологической реакции (+17%), доля HF была незначительно снижена (-9%). Полученные данные соответствовали нормальному алгоритму перестройки ВНС на фоне ортопробы и описывали достаточную ее реактивность и надежность вегетативного обеспечения деятельности сердечно-сосудистой системы. Значения индекса напряженности (ИН) как фоновой записи, так и в ортопробе не имели статистически значимой разницы между изучаемой группой и контрольной.

Таким образом, в группе врачей-дежурантов были выявлены элементы перестройки модели вегетативной регуляции, которые заключались в снижении общей мощности (участия) всех компонентов ВНС, в первую очередь парасимпатического звена, однако выраженных изменений, затрагивающих нарушение вегетативной реактивности, вегетативного обеспечения деятельности и централизации управления выявлено не было.

При сравнении значений всех анализируемых выше параметров ВРС группы машинистов локомотивов и группы врачей-дежурантов между собой была выявлена статистически значимая разница. Основываясь на гипотезе о разности степеней напряженности труда на фоне схожих принципов перестройки циркадных ритмов в исследуемых группах, было сделано предположение о характере перестройки моделей регуляции как о стадийности дизрегуляционного процесса.

### Заключение

Результаты проведенного исследования убедительно показали, что характер «экстремальных» профессий реверсным образом может истощать адаптационные ресурсы здорового организма, снижая запас прочности адаптационных механизмов, обеспечивающих «протекцию» физиологической регуляции вегетативных функций [4, 14, 16, 25].

Данные спектрального и временного анализа ритма сердца, как в группе машинистов, так и в группе врачей-дежурантов, дают основание обсуждать перестройку модели регуляции сердечного ритма в сравнении с группой контроля, которую можно трактовать как «ремоделирование вегетативной регуляции».

Перестройка данной модели, не изменяющая основные гомеостатические показатели организма, может приводить к формированию неоптимальной, инертной схемы на основе преобладания симпато-гуморального (центрального) контура регуляции, увеличивающая риск фатальных осложнений в работе сердечно-сосудистой системы в долгосрочной перспективе [4, 7, 26]. В основе такого ремоделирования лежат структурно-дисфункциональные изменения, в первую очередь парасимпатического, а также симпатического и гуморального звеньев, свидетельствующие о начальном снижении «запаса прочности» функциональных систем организма, по типу дизрегуляции [9].

При этом степень ремоделирования в исследуемых группах различна. На примере врачей-дежурантов можно проследить признаки начальной стадии перестройки модели регуляции ВНС: отмечается лишь некоторое снижение общей регуляторной мощности ВНС в фоновой записи, в частности парасимпатического звена, «редуцирование» которого приближено к статистически значимой разнице по отношению к контрольной группе. Это находит отражение в снижении показателей анализа ВРС в фоновой записи как ТР, HF при отсутствии статистически значимых изменений в ортостатической пробе. Следующая стадия является патофизиологически закономерной при персистенции провоцирующих факторов и высокой степени напряжения физиологических систем и

наглядно отражена в изменениях параметров ВРС в группе машинистов локомотивов: наряду со снижением в фоновой записи общей регуляторной мощности ВНС, снижением активности ПНС, выявляются признаки активации СНС, снижения реактивности ВНС и централизации регуляции. Эти изменения продемонстрированы снижением таких показателей как ТР, LF, HF в фоновой записи, увеличением VLF в ортостатической пробе, а также нарастанием значений ИН.

Централизация регуляторных механизмов осуществляется через активацию гуморального контура регуляции, обеспечивающего «неоптимальную» реактивность ВНС на фоне ее субкомпенсации. В случае продолжающегося действия патологического фактора возможен переход изменений в регуляции ВНС к следующей (необратимой) стадии — декомпенсации, или дизрегуляционной патологии.

Таким образом, проведенное исследование убедительно показывает, что перестройка модели регуляции вегетативных функций, имеет определенную последовательность, отражая стадии вегетативной дизрегуляции.

В связи с этим, важным аспектом является определение начальных изменений регуляторной функции с целью своевременного предупреждения развития дизрегуляционной патологии и профилактики развития необратимых нозологических состояний. В качестве наиболее ранних предикторов развития дизрегуляционного процесса ВНС были выявлены параметры, отражающие общую мощность вегетативной регуляции (ТР) и, в особенности, ее парасимпатическое звено (HF).

### Список литературы

1. Цфасман А.З. *Железнодорожная клиническая медицина*. Профессиональные болезни. М.: РАПС, 2000: 8-12.
2. Цфасман А.З., Алпаев Д.В. *Циркадная ритмика артериального давления при измененном суточном ритме жизни*. М., Издательство «Репроцентр М», 2010: 8-12, 73-7.
3. Anderson CJ. The psychology of doing nothing. *Psychological Bulletin*. 2003; 129: 139-67.
4. Меркулов Ю.А., Пятков А.А., Меркулова Д.М. Работа с ночными сменами как фактор дизрегуляции вегетативной нервной системы у машинистов локомотивов // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. — 2013. — С.75-81.
5. Станиславчук Н.А., Кульчицкая Е.Н. Особенности функционального состояния автономной нервной системы у больных с синдромом раздраженного кишечника. *Патогенез*. -2013;11(3): 74-7.
6. Peter A. van Zwieten. *European Society of Hypertension Scientific Newsletter*, 2003: 4-18.
7. Баевский Р.М., Берсенева А.П., Берсенев Е.Ю., Ешманова А.К. Использование принципов донозологи-

ческой диагностики для оценки функционального состояния организма при стрессорных воздействиях (на примере водителей автобусов). *Физиология человека*. 2009; 35(1): 41-51.

8. Baevsky R.M., Chernikova A.G. Heart rate variability analysis in evaluation of functional state in humans during long-term space flight. *Adv. Space Res.* 1998; 2(2): 14 Man in Space Symposium, Banff, Alberta, Canada, May 2003.

9. Гусев Е.И., Крыжановский Г.Н. *Дизрегуляторная патология нервной системы*. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2009: 19-23, 148-52.

10. Решетняк В.К. Дизрегуляция дыхания и артериального давления во время сна. *Патогенез*. 2011;9(1): 4-13.

11. Shiraiishi M., Kamo T., Kamegai M. et al. Periodic structures and diurnal variation in blood pressure and heart rate in relation to microgravity on space station MIR. *Biomed Pharmacother.* 2004 Oct; 58 Suppl 1: P. 31-4.

12. Берсенев Е.Ю., Воронов А.В., Баевский Р.М. Половые особенности variability сердечного ритма у юных спортсменов в разные периоды суток. *Медико-биологические технологии повышения работоспособности в условиях напряженных физических нагрузок*. Выпуск 2. Сборник статей. 2006. С. 137-48.

13. Mourot L., Bouhaddi M., Perrey S., et al. Decrease in heart rate variability with overtraining: assessment by the Poincaré plot analysis. *Clin Physiol Funct Imaging*. -2004; 24(1): 10-8.

14. Еськов В.М., Кашина Ю.В., Мишина Е.А., Филатова М.А. Состояние функциональных систем организма человека в условиях нарушения суточной ритмики. *Вестник новых медицинских технологий*. 2007; XIV(1):27-9.

15. Королева М.А. Оценка вегетативной регуляции сердечного ритма на фоне 24-часовой депривации сна и после интенсивного светового воздействия. *Вестник ТГУ*. 2009, Т.14, вып.1: 48-51.

16. Кружлов В.Н. *Нарушения вегетативной регуляции и синдром артериальной гипертензии у работников локомотивных бригад с шейным миофасциальным болевым синдромом*. Казань, 2007.

17. Меркулов Ю.А., Калашников А.А., Пятков А.А., Щербенкова А.Л., Чернова П.А., Меркулова Д.М. Кардиоваскулярные проявления вегетативной полиневропатии. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2011; Т.111:71-9.

18. Порядин Г.В., Богинская О.А., Обрубов С.А., Пыков М.И., Колбатова Е.С., Дубовик Л.Г. Особенности состояния вегетативной нервной системы у детей с близорукостью, ассоциированной с недифференцированной дисплазией соединительной ткани. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2013; 3: 27-31.

19. Chung MH., Kuo TB., Hsu N., et al. Comparison of sleep-related cardiac autonomic function between rotating-shift and permanent night-shift workers. *Ind. Health*. 2011;49(5):589-96. Epub. 2011 Aug 1.

20. Ishii N., Iwata T., Dakeishi M., Murata K. Effects of shift work on autonomic and neuromotor functions in female nurses. 2004 Sep;46(5):352-8.

21. Togo F., Takahashi M. Heart rate variability in occupational health a systematic review. -2009 Dec;47(6):589-602.

22. Хананашвили М.М. Теория переходного состояния между нормой и патологией. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2012;1:3-12.

23. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart Rate Variability. Standards of Measurements, Physiological Interpretation, and Clinical Use. *Circulation* 1996;93:1043-65.

24. Михайлов В.М. *Вариабельность ритма сердца: опыт практического применения метода*. Иваново, 2002: 288 с.

25. Pankova V.B., Kaptsov V.A., Ermakova T.V., Kameleva E.A. Priorities of health-promoting and medical rehabilitation in railwaymen. *Gig Sanit.* 2007; (1): 34-6.

26. Makhovskaya T., Serduk N., Chernykh E., Khandurina G. Rhythmographia for detection predictors of violations of a rhythm in railways workers. *JRME NIIGATA*, 2004 The Eleventh International Symposium of the Japan-Russia Medical Exchange. 2004. Nngata, 2004.

## References

1. Tsfasman A.Z. Railway clinical medicine. Occupational diseases. М.: RAPS, 2000. — S. 8-12.

2. Tsfasman A.Z., Alpaev D.V. Circadian rhythm of blood pressure in the changes of the daily rhythm of life. — М., Izdatelstvo «Reprintsentr М», 2010, S. 8-12, 73-7.

3. Anderson CJ. The psychology of doing nothing. *Psychological Bulletin*. 2003; 129: 139-167.

4. Merkulov Y.A., Pyatkov A.A., Merkulova D.M. Night shift work as a dysregulation factor of the autonomic nervous system in locomotive drivers. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2013: S.75-81.

5. Stanislavchuk N.A., Kulchitskaya E.N. Autonomic nervous system functional state features in patients with irritable bowel syndrome. *Patogenez*. 2013; 11, 3: S.74-77.

6. Peter A. van Zwieten — European Society of Hypertension Scientific Newsletter, 2003: P. 4-18.

7. Baevsky R.M., Berseneva A.P., Bersenev E.Y., Eshmanova A.K. Using the Principles of Preclinical Diagnosis for Evaluation of the Functional State of the Organism under Stress Influences (as exemplified by bus drivers). // *Fiziologiya cheloveka*. 2009. T.35. 1: 41-51.

8. Baevsky R.M., Chernikova A.G. Heart rate variability analysis in evaluation of functional state in humans during long-term space flight. *Adv. Space Res.*, 1998; 2, 2, 14 Man in Space Symposium, Banff, Alberta, Canada, May 2003.

9. Gusev E.I., Kryzhanovsky G.N. Dysregulation Pathology of the Nervous System. М.: ООО «Медицинское информационное агенstvo», 2009. S. 19-23, 148-152.

10. Reshetnyak V.K. Dysregulation of respiration and blood pressure during sleep. *Patogenez*. 2011; 9, 1: S.4-13.

11. Shiraiishi M., Kamo T., Kamegai M. et al. Periodic structures and diurnal variation in blood pressure and heart rate in relation to microgravity on space station MIR. *Biomed Pharmacother.* 2004 Oct; 58 Suppl 1: P. 31-4.

12. Bersenev E.Y., Voronov A.V., Baevsky R.M. Sexual Features of Heart Rate Variability in Young Athletes in Different Periods of the Day. *Mediko-biologicheskie tehnologii povysheniya rabotosposobnosti v usloviyah napryazhennykh fizicheskikh nagruzok*. Vypusk 2. Sbornik statey. 2006. S. 137-148.

13. Mourot L., Bouhaddi M., Perrey S., et al. Decrease in heart rate variability with overtraining: assessment by the Poincaré plot analysis. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2004 Jan; 24(1): 10-8.



14. Eskov V.M., Kashina Y.V., Mishina E.A., Filatova M.A. Condition of the human body functional systems in a daily rhythm violation. *Vestnik novykh medicinskih tekhnologiy*. — 2007, T. XIV, 1 — S. 27-29.
15. Korleva M.A. Assessment of heart rate autonomic regulation on the background of the 24-hour sleep deprivation, and after intense light exposure. *Vestnik TGU* — 2009, T.14, vyp.1. — S. 48-51.
16. Kruglov V.N. Autonomic regulation disorder and arterial hypertension syndrome in workers of locomotive brigades with cervical myofascial pain syndrome. — Kazan, 2007.
17. Merkulov Y.A., Kalashnikov A.A., Pyatkov A.A., Scherbenkova A.L., Chernova P.A., Merkulova D.M. Cardiovascular manifestations of autonomic polyneuropathy. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2011; T.111: S.71-79.
18. Poruadin G.V., Boginskaya O.A., Obrubov S.A., Pyatkov M.I., Kolbatova E.S., Dubovik L.G. Autonomic nervous system state features in children with myopia associated with undifferentiated connective tissue dysplasia. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2013. 3: 27-31.
19. Chung MH., Kuo TB., Hsu N., et al. Comparison of sleep-related cardiac autonomic function between rotating-shift and permanent night-shift workers. *Ind. Health*. 2011;49(5):589-96. Epub. 2011 Aug 1.
20. Ishii N., Iwata T., Dakeishi M., Murata K. Effects of shift work on autonomic and neuromotor functions in female nurses. *J Occup. Health*. 2004 Sep;46(5):352-8.
21. Togo F., Takahashi M. Heart rate variability in occupational health a systematic review. *Ind. Health*. 2009 Dec;47(6):589-602.
22. Hananashvili M.M. The theory of the transition state between norm and pathology. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2012. 1: S.3-12.
23. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart Rate Variability. Standards of Measurements, Physiological Interpretation, and Clinical Use. *Circulation* 1996;93:1043-1065.
24. Mihaylov V.M. Heart rate variability: the experience of the practical application of the method. — Ivanovo, 2002. — 288 s.
25. Pankova V.B., Kaptsov V.A., Ermakova T.V., Kameneva E.A. Priorities of health-promoting and medical rehabilitation in railwaymen. *Gig Sanit*. 2007 Jan-Feb; (1): 34-6.
26. Makhovskaya T., Serduk N., Chernykh E., Khandurina G. Rhythmographia for detection predictors of violations of a rhythm in railway workers. *JRME NIIGATA*, 2004 The Eleventh International Symposium of the Japan-Russia Medical Exchange 2004 — Nngata, 2004.

Поступила 10.11.14  
Received 10.11.14

#### Сведения об авторах:

Артём Александрович Пятков — врач-невролог Московского научно-практического центра медицинской реабилитации, восстановительной и спортивной медицины. E-mail: [contradolor@mail.ru](mailto:contradolor@mail.ru)

Дина Мироновна Меркулова — д.м.н., гл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы НИИ общей патологии и патофизиологии, профессор кафедры нервных болезней ИПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, врач-невролог высшей категории, руководитель Неврологического Центра им. Б.М. Гехта ОАО «РЖД», заслуженный врач РФ. E-mail: [dinamerk@mail.ru](mailto:dinamerk@mail.ru)

Дзугкоев С.Г.<sup>1</sup>, Можаяева И.В.<sup>1</sup>, Гиголаева Л.В.<sup>2</sup>, Тедтоева А.И.<sup>1</sup>, Маргиева О.И.<sup>1</sup>, Дзугкоева Ф.С.<sup>1</sup>

## **Изменение биохимических показателей крови на фоне регуляторов экспрессии эндотелиальной NO-синтазы при кобальтовой интоксикации**

<sup>1</sup> — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биомедицинских исследований ВНЦ РАН и Правительства РСО — Алания, отдел патобиохимии, Россия, 362019, г. Владикавказ, ул. Пушкинская, 43

<sup>2</sup> — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 362019, РСО-Алания, г. Владикавказ, ул. Пушкинская, 40

*На фоне хронической кобальтовой интоксикации у крыс развивается окислительный стресс, сопровождающийся снижением содержания суммарных метаболитов оксида азота в сыворотке крови. Причинами понижения уровня вазодилатирующего фактора являются дефицит L-аргинина, повышение уровня ингибитора NOS-3. Выявлено снижение биодоступности оксида азота, вследствие повышения содержания окисленных липопротеинов низкой плотности (ЛНП), общего холестерина и снижение холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛВП).*

**Ключевые слова:** окислительный стресс, оксид азота, хлорид кобальта, L-аргинин, L-NAME, NOS-3

Dzugkoev S.G.<sup>1</sup>, Mozhayeva I.V.<sup>1</sup>, Gigolaeva L.B.<sup>2</sup>, Tedtoeva A.I.<sup>1</sup>, Margieva O.I.<sup>1</sup>, Dzugkoeva F.S.<sup>1</sup>

## **The changes in the biochemical indices of blood in cobalt intoxication on the background of the regulators of the expression of endothelial NO-synthase**

*On the background of chronic cobalt intoxication in rats develops oxidative stress. This is accompanied by a decrease in the content of total metabolites of nitric oxide in the blood serum. The reasons for lower levels of the vasodilatation factor are the following: a deficiency of L-arginine and the increase in the content of the inhibitor of NOS-3. We found a decrease in the bioavailability of nitric oxide due to the increase in the content of oxidized low density lipids, total cholesterol and cholesterol-lowering lipids high density.*

**Key words:** oxidative stress, nitric oxide, cobalt chloride, L-arginine, L-NAME, NOS-3

В условиях системного окислительного стресса при кобальтовой интоксикации нарушается функция сосудистого эндотелия, обусловленная снижением продукции эндотелиальными клетками (ЭК) важнейшего вазодилатирующего фактора оксида азота (NO), или нарушением его биодоступности [1]. Причинами пониженного уровня NO в сыворотке крови при кобальтовой интоксикации могут быть дефицит L-аргинина, снижение его доступности для фермента эндотелиальной NO-синтазы (NOS-3), повышенный уровень в плазме крови ассиметричного диметиларгинина (АДМА) — эндогенного конкурентного ингибитора NOS-3 [2], наличие в сыворотке крови окисленных ЛНП (окЛНП) и взаимодействие NO с супероксид анион радикалом с образованием пероксинитрита — сильного окислителя.

Цель исследования — изучение влияния эндогенных регуляторов экспрессии NOS-3 на гомеостаз оксида азота и показатели липидного обмена у крыс с кобальтовой интоксикацией.

### **Методика**

Исследование проведено на крысах-самцах Вистар одной возрастной группы (10—14 мес.), массой 220—250 г, интактных и с кобальтовой интоксикацией. Содержание крыс в виварии и проведение экспериментов соответствовали «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных», и принципам Хельсинкской декларации (2000 г.). Все животные в течение эксперимента получали специальную безнитритную-нитратную диету (поставляемую ООО «Лабораторкорм»), сбалансированную по аминокислотному составу, минеральным веществам и витаминам. Интоксикацию хлоридом кобальта вызывали парентеральным введением  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  в дозе 2 мг/кг массы тела в течение 1 мес. В ходе эксперимента определяли: состояние

**Для корреспонденции:** Дзугкоев Сергей Гаврилович — д.м.н., ст. науч. сотр. отдела патобиохимии ФГБУН Институт биомедицинских исследований ВНЦ РАН и Правительства РСО — Алания, Россия, 362019, г. Владикавказ, ул. Пушкинская, 43, тел. 8-901-497-20-14. E-mail: patbiochem@mail.ru

липидного обмена по уровню общего холестерина (ХС), ХС ЛНП, ХС ЛВП, триглицеридов в крови и интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в эритроцитах по концентрации вторичного продукта — малонового диальдегида (МДА) [3]. О состоянии антиоксидантной системы судили по активности супероксиддисмутазы (СОД) [4], каталазы [5] и концентрации церулоплазмينا (ЦП) [6] в сыворотке крови. Определяли концентрацию стабильных суммарных конечных метаболитов оксида азота ( $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_x$ ) в сыворотке крови [7]. Подопытные крысы были разбиты на следующие группы:

- 1) контрольные;
- 2) с кобальтовой интоксикацией;
- 3) интактные с введением L-аргинина;
- 4) с кобальтовой интоксикацией + L-аргинин;
- 5) с кобальтовой интоксикацией + L-аргинин + коэнзим  $\text{Q}_{10}$ ;
- 6) интактные с введением L-NAME;
- 7) с кобальтовой интоксикацией + L-NAME;
- 8) с кобальтовой интоксикацией + L-NAME + коэнзим  $\text{Q}_{10}$ .

В каждой экспериментальной группе было по 20 животных. L-аргинин (10 мг/кг), L-NAME (25 мг/кг), коэнзим  $\text{Q}_{10}$  (0,11 мл/100 г) вводили ежедневно парентерально в течение месяца.

Статистическую обработку проводили с помощью программы Microsoft Excel 2006. Результаты представлены в виде среднего значения (Mean) и ошибки среднего (SEM). Достоверность различий между показателями контрольной и опытной групп оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Полученные данные показали, что на фоне интоксикации  $\text{CoCl}_2$  происходит активация системы свободнорадикального окисления, о чём свидетельствует статистически значимое повышение концентрации МДА в эритроцитах. Активация процессов перекисного окисления липидов сопровождается изменениями активности ферментов антиокислительной системы (АОС) организма, о чём свидетельствует снижение активности СОД, повышение активности каталазы и концентрации ЦП, таким образом, активация процессов липопероксидации происходит на фоне угнетения системы антиокислительной защиты (АОЗ) клеток, что согласуется с данными других исследователей [8]. При длительном введении хлорида кобальта ксенобиотик кумулируется и вызывает значительное снижение активности фермента СОД, превращающего супероксиданион радикал  $\text{O}_2^-$  в перекись водорода.

На фоне окислительного стресса были изучены метаболические изменения под влиянием субстрата

NOS-3 L-аргинина и ингибитора NO-продуцирующего фермента — L-NAME и их комбинации с коэнзимом  $\text{Q}_{10}$ . Полученные результаты представлены в таблице. У крыс интоксикация кобальтом на фоне введения L-аргинина и L-аргинин + коэнзим  $\text{Q}_{10}$  (4-я и 5-я группы) сопровождается снижением концентрации МДА, повышением активности СОД, а каталазы и концентрация ЦП — снижаются. Эти изменения в системе ПОЛ-АОС сопровождались повышением содержания  $\text{NO}_x$  (таблица). Прирост уровня L-аргинина в крови сопровождается усиленным образованием промежуточного продукта метаболизма аргинина  $\text{N}^G$ -гидрокси-L-аргинина в ЭК, обладающего способностью ускорять реакцию окисления аргинина NOS-3, а также тормозить активность аргиназы, расщепляющей аргинин на мочевину и орнитин. Следовательно, лечение в этих группах сопровождается устранением дисбаланса в системе свободнорадикального окисления и статистически значимым повышением концентрации  $\text{NO}_x$  в сыворотке крови. При сравнении результатов, полученных под влиянием L-аргинина и комбинации L-аргинина с коэнзимом  $\text{Q}_{10}$ , обнаружилось, что наиболее высокая концентрация  $\text{NO}_x$  выявлена в группе крыс на фоне комплексного лечения (таблица). На основании этих данных можно заключить, что одной из причин снижения NO в сыворотке крови является дефицит субстрата — L-аргинина и нарушение функционирования цепи переноса электронов на уровне III комплекса — коэнзим  $\text{Q}_{10}$  — цитохром C — редуктазы. Комбинированное применение L-аргинина с коэнзимом  $\text{Q}_{10}$  способствовало угнетению процессов ПОЛ, повышению биодоступности субстрата, восстановлению физико-химических свойств мембран ЭК, что согласуется с данными литературы и нашей лаборатории [9, 10].

Для выяснения роли эндогенного конкурентного ингибитора NOS-3 — АДМА мы вводили интактным крысам и крысам с кобальтовой интоксикацией его аналог — L-NAME. Полученные данные показали, что на фоне его введения возросли показатели интенсивности ПОЛ. Так, концентрация МДА в эритроцитах увеличилась статистически значимо при одновременном снижении активности СОД, повышении активности каталазы и концентрации ЦП. Одновременно снизилась концентрация  $\text{NO}_x$  в сыворотке крови у крыс с кобальтовой интоксикацией. Это могло быть обусловлено недостаточностью одного из кофакторов реакции — тетрагидробиоптерина ( $\text{BH}_4$ ), «разобщением» оксидазного и редуктазного доменов NOS-3, когда фермент вместо NO продуцирует АФК [11]. Введение коэнзима  $\text{Q}_{10}$  на фоне L-NAME способствовало устранению дисбаланса в системе ПОЛ-АОС и одновременно повышению

Изменение биохимических показателей крови на фоне регуляторов экспрессии eNOS у крыс с хронической кобальтовой интоксикацией

| Показатели   | МДА,<br>нмоль/мл           | СОД,<br>ед.акт             | Каталаза,<br>мкат/л         | ЦП,<br>мг/л                  | NO,<br>мкмоль              | ОХС,<br>ммоль/л            | ХС ЛНП,<br>ммоль/л          | ХС ЛВП,<br>ммоль/л          |
|--|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Норма  | 4,54 ± 0,031               | 88,28 ± 1,32               | 225,57 ± 25,77              | 338,6 ± 6,23                 | 51,1 ± 0,083               | 1,88 ± 0,033               | 1,09 ± 0,031                | 0,67 ± 0,031                |
| CoCl <sub>2</sub>  | 5,05 ± 0,032 <sup>a</sup>  | 63,86 ± 1,271 <sup>a</sup> | 370,2 ± 6,11 <sup>a</sup>   | 379,2 ± 6,56 <sup>a</sup>    | 41,03 ± 0,039 <sup>a</sup> | 3,86 ± 0,033 <sup>a</sup>  | 3,15 ± 0,01 <sup>a</sup>    | 0,502 ± 0,032 <sup>a</sup>  |
| L-аргинин  | 4,34 ± 0,032 <sup>b</sup>  | 88,8 ± 1,37 <sup>b</sup>   | 221,72 ± 8,71 <sup>b</sup>  | 336,4 ± 6,39 <sup>b</sup>    | 53,25 ± 0,08 <sup>b</sup>  | 1,84 ± 0,029 <sup>b</sup>  | 1,04 ± 0,03 <sup>b</sup>    | 0,7 ± 0,032 <sup>b</sup>    |
| CoCl <sub>2</sub><br>L-аргинин <sup>+</sup>                            | 4,86 ± 0,031 <sup>b</sup>  | 65,4 ± 1,5 <sup>b</sup>    | 359,4 ± 6,8 <sup>b</sup>    | 359,8 ± 5,58 <sup>bb</sup>   | 43,14 ± 0,32 <sup>b</sup>  | 3,52 ± 0,276 <sup>b</sup>  | 2,82 ± 0,13 <sup>b</sup>    | 0,52 ± 0,027 <sup>b</sup>   |
| CoCl <sub>2</sub><br>L-аргинин <sup>+</sup><br>коэнзим Q <sub>10</sub> | 4,5 ± 0,029 <sup>г</sup>   | 87 ± 1,92                  | 231,12 ± 6,52               | 348 ± 6,21                   | 50,2 ± 0,364 <sup>г</sup>  | 2,05 ± 0,282               | 1,32 ± 0,01 <sup>г</sup>    | 0,96 ± 0,03 <sup>г</sup>    |
| L-NAME   | 4,752 ± 0,032 <sup>д</sup> | 82,74 ± 2,77 <sup>д</sup>  | 275 ± 06,18 <sup>д</sup>    | 360,2 ± 1,157 <sup>д</sup>   | 43 ± 0,707 <sup>д</sup>    | 2,082 ± 0,010 <sup>д</sup> | 1,114 ± 0,010 <sup>д</sup>  | 0,6528 ± 0,031 <sup>д</sup> |
| CoCl <sub>2</sub><br>L-NAME <sup>+</sup>                               | 5,776 ± 0,07 <sup>е</sup>  | 60,56 ± 1,89 <sup>е</sup>  | 375,44 ± 6,60 <sup>е</sup>  | 382,2 ± 3,5 <sup>еее</sup>   | 39,56 ± 0,32 <sup>е</sup>  | 4,008 ± 0,01 <sup>е</sup>  | 3,212 ± 0,011 <sup>е</sup>  | 0,481 ± 0,031 <sup>ее</sup> |
| CoCl <sub>2</sub><br>L-NAME <sup>+</sup><br>коэнзим Q <sub>10</sub>    | 4,622 ± 0,03 <sup>ж</sup>  | 72,96 ± 1,39 <sup>жж</sup> | 330,62 ± 7,041 <sup>ж</sup> | 369,82 ± 4,04 <sup>жжж</sup> | 43,86 ± 0,42               | 2,992 ± 0,010 <sup>ж</sup> | 2,248 ± 0,0478 <sup>ж</sup> | 0,6024 ± 0,016              |

Примечание. <sup>a</sup> — достоверность CoCl<sub>2</sub> относительно нормы; <sup>b</sup> — достоверность норма + аргинин относительно CoCl<sub>2</sub> + аргинин; в — достоверность CoCl<sub>2</sub> + аргинин относительно CoCl<sub>2</sub> + L-аргинин + коэнзим Q<sub>10</sub>; <sup>г</sup> — достоверность норма + аргинин относительно CoCl<sub>2</sub> + L-аргинин + коэнзим Q<sub>10</sub>; <sup>д</sup> — достоверность норма + L-NAME относительно CoCl<sub>2</sub> + L-NAME; <sup>е</sup> — достоверность CoCl<sub>2</sub> + L-NAME относительно CoCl<sub>2</sub> + L-NAME + коэнзим Q<sub>10</sub>; <sup>ж</sup> — достоверность CoCl<sub>2</sub> + L-NAME + коэнзим Q<sub>10</sub> относительно CoCl<sub>2</sub> + L-NAME, <sup>a</sup> — p<0,001; <sup>aa</sup> — p<0,01; <sup>aaa</sup> — p<0,05

концентрации NOx (таблица). Следовательно, коэнзим Q<sub>10</sub>, угнетая образование активных метаболитов кислорода, способствует, возможно, регенерации восстановленной формы тетрагидробиоптерина, обеспечивает «сопряжение» молекулярного O<sub>2</sub> с окисленным L-аргином, а также поддерживает стабильность молекулы фермента.

На транспорт L-аргинина в ЭК оказывают влияние окЛНП и лизофосфатидилхолин. В связи с этим, в другом варианте исследований определяли уровни общего ХС и холестерина входящего в состав липопротеинов отдельных классов. Данные показали статистически значимое повышение концентрации общего ХС и ХС ЛНП, триглицеридов, снижение уровня ХС ЛВП, у крыс с кобальтовой интоксикацией на фоне L-NAME. Установленное увеличение содержания в крови активных форм кислорода (АФК) и вторичного продукта ПОЛ — МДА может вызвать окислительную модификацию ЛНП и их основного аполипопротеина (апо) В-100. Энзиматическое превращение фосфатидилхолина в лизофосфатидилхолин под действием фосфолипазы, связанной с окЛНП, способствует нарушению транспорта L-аргинина из сыворотки крови в ЭК, уменьшению образования NO и снижению его биодоступности. При введении L-аргинина крысам с кобальтовой интоксикацией было обнаружено некоторое снижение содержания общего ХС и ХС ЛНП, а комбинация L-аргинина с коэнзимом Q<sub>10</sub> вызвала статистически

значимое снижение уровней общего ХС, ХС ЛНП и повышение уровня ХС ЛВП (таблица).

Полученные результаты согласуются с данными литературы о торможении окЛНП высвобождения NO эндотелиальными клетками [12—14]. Более того, АФК обладают способностью ингибировать экспрессию eNOS и могут уменьшать продукцию NO. На фоне введения коэнзима Q<sub>10</sub> + L-NAME показано существенное снижение концентрации общего ХС, ХС ЛНП и повышение ХС ЛВП, хотя эти изменения происходят на более низком уровне по сравнению с данными на фоне комбинации L-аргинина + коэнзим Q<sub>10</sub>. Результаты исследований в двух вариантах: на фоне субстрата NOS-3 — L-аргинина и ингибитора экспрессии фермента — L-NAME позволяют судить о возможном изменении уровня экспрессии NOS-3. Введение L-аргинина, возможно, повышает уровень экспрессии фермента, тогда как L-NAME способствует ингибированию этого процесса. Коэнзим Q<sub>10</sub> в обоих вариантах исследований оказывает свое положительное влияние. Эта способность коэнзима Q<sub>10</sub> подтверждается исследованиями нашей лаборатории [2, 15].

Таким образом, при кобальтовой интоксикации в условиях выраженных метаболических изменений, сопровождающихся активацией перекисных процессов, страдает система, ответственная за продукцию NO. Индуцируемый хлоридом кобальта окислительный стресс и сниженная активность защитных антиоксидантных систем, приводят к дисбалансу между

продукцией NO и нейтрализацией АФК, дефициту субстрата L-аргинина и повышению в крови концентрации ингибитора eNOS, что, возможно, играет роль в снижении уровня экспрессии eNOS в эндотелии сосудов. Сочетанное применение коэнзима Q<sub>10</sub> с L-аргинином является положительным фактором, влияющим на уровень экспрессии eNOS, изменение концентрации NO и его биодоступности, вследствие нормализации обмена холестерина.

### Список литературы

1. Дзугкоев С.Г., Калоева М.Б., Дзугкоева Ф.С. Влияние комплексного лечения с коэнзимом Q<sub>10</sub> на функциональные и метаболические показатели у больных сахарным диабетом типа 1. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2011; 152(9): 334-6.
2. Дзугкоев С.Г., Дзугкоева Ф.С., Гуманова Н.Г., Метельская В.А. Влияние коэнзима Q<sub>10</sub>, афобазола и L-карнитина и их комбинации с L-аргинином на эндотелиальную функцию у крыс с экспериментальным сахарным диабетом. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2012; 11:9-53.
3. Дзугкоев С.Г., Метельская В.А., Можаяева И.В., Дзугкоева Ф.С. Влияние комплексного гомеопатического препарата, содержащего убихинон на показатели окислительного стресса и гемодинамики при экспериментальном сахарном диабете. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2010; 6 (3): 376-80.
4. Дзугкоев С.Г., Метельская В.А., Дзугкоева Ф.С. Роль оксида азота в формировании эндотелиальной дисфункции при СД. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2010; 8: 63-8.
5. Камышников В.С. *Клинико-биохимическая лабораторная диагностика*. 2003; Т.2. 71-7.
6. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. *Лабораторное дело*. 1988; 1: 16-9.
7. Ланкин В.З. Интенсификация *in vivo* свободнорадикального окисления липопротеинов низкой плотности в плазме крови больных ИБС при терапии ингибитором HMG-CoA-редуктазы правастатином и подавление липопероксидации убихиноном Q<sub>10</sub>. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2000;129(2): 176-9.
8. Макаревич О.П., Голиков П.П. *Лабораторное дело*. 1983;6: 24-7.
9. Мартынова С.Н., Горбач Т.В. Влияние солей кобальта на показатели энергетического обмена в митохондриях нефроцитов крыс. *Вестник Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина. Серия: биология*. 2009; Вып. 9; №856:24-8.
10. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2005; 6:15-8.
11. Asakawa T., Matsushita S. *Lipids*. 1980. 15(3): 137-40.
12. Jay M.T., Chirico S., Siow R.C. et al. Modulation of vascular tone by low density lipoproteins: effects on L-arginine transport and nitric oxide synthesis. *Exp Physiol*. 1997; 82:49-60.
13. Plane F., Bruckdorber K.R., Kerr P. et al. Inhibition of NO-relase by lowdensity lipoproteins in vascular endothelium. *Br.J. Pharmacol*. 1992; 105; 216-22.
14. Toutouzas K., Riga M., Stefanidi E., et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and other endogenous nitric

oxide synthase inhibitors as an important cause of vascular insulin resistance. *Horm Metab Res*. 2008; 40: 655-9.

15. Zulli A., Widdop B., Hare D.L. et al. High methionine and cholesterol diet abolishes endothelial relaxation. *Arterioscler. Thromb. vasc. Biol*. 2003; 23: P. 1358-63.

### References

1. Dzugkoev S.G., Metel'skaya V.A., Mozhaeva I.V., Dzugkoeva F.S. Vliyanie kompleksnogo gomeopaticheskogo preparata, soderzhashchego ubikhinon na pokazateli oksislitel'nogo stressa i gemodinamiki pri eksperimental'nom sakharnom diabete. *Ratsional'naya farmakoterapiya v kardiologii*. 2010; 6 (3): 376-80. (in Russian)
2. Dzugkoev S.G., Metel'skaya V.A., Dzugkoeva F.S. Rol' oksida azota v formirovanii endotelial'noy disfunktsii pri SD. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2010; 8: 63-8. (in Russian)
3. Asakawa T., Matsushita S. *Lipids*. 1980. 15(3): 137-40.
4. Makarevich O. P., Golikov P.P. *Laboratornoe delo*. 1983;6: 24-7. (in Russian)
5. Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G. *Laboratornoe delo*. 1988; 1: 16-9. (in Russian)
6. Kamyshnikov V.S. *Kliniko-biokhimicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2003; T.2. 71-8. (in Russian)
7. Metel'skaya V.A., Gumanova N.G. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2005; 6:15.
8. Martynova S.N., Gorbach T.V. Vliyanie soley koba'l'ta na pokazateli energeticheskogo obmena v mitokhondriyakh nefrotsitov kryes. *Vestnik Khar'kovskogo natsional'nogo universiteta imeni V.N. Karazina. Seriya: biologiya*. 2009; Vyp. 9; 856:24-8. (in Russian)
9. Dzugkoev S.G., Dzugkoeva F.S., Gumanova N.G., Metel'skaya V.A. Vliyanie koenzima Q10 , afobazola i L-karnitina i ikh kombinatsii s L-argininom na endotelial'nyuyu funktsiyu u kryes s eksperimental'nym sakharnym diabedom. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*. 2012; 11:9-53. (in Russian)
10. Lankin V.Z. Intensifikatsiya in vivo svobodnoradikal'nogo oksleniya lipoproteinov nizkoy plotnosti v plazme krovi bol'nykh IBS pri terapii ingibitorom HMG-CoA-reduktazy pravastatinom i podavlenie lipoperoksidatsii ubikhinonom Q<sub>10</sub>. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2000;129(2): 176-9. (in Russian)
11. Plane F., Bruckdorber K.R., Kerr P. et al. Inhibition of NO-relase by lowdensity lipoproteins in vascular endothelium. *Br.J. Pharmacol*. 1992; 105; 216-22.
12. Jay M.T., Chirico S, Siow R.C. et al. Modulation of vascular tone by low density lipoproteins: effects on L-arginine transport and nitric oxide synthesis. *Exp Physiol*. 1997; 82:49-60.
13. Toutouzas K., Riga M., Stefanidi E. et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and other endogenous nitric oxide synthase inhibitors as an important cause of vascular insulin resistance. *Horm Metab Res*. 2008; 40: 655-9.
14. Zulli A., Widdop B., Hare D.L. et al. High methionine and cholesterol diet abolishes endothelial relaxation. *Arterioscler. Thromb. vasc. Biol*. 2003; 23: R. 1358-63.
15. Dzugkoev S.G., Kaloeva M.B., Dzugkoeva F.S. Vliyanie kompleksnogo lecheniya s koenzimom Q10 na funktsional'nye i metabolicheskie pokazateli u bol'nykh sakharnym diabedom tipa 1. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2011; 152(9): 334-6. (in Russian)

Поступила 01.12.14

Received 01.12.14

**Сведения об авторах:**

*Можаева Ирина Викторовна* — младший научный сотрудник отдела патобиохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биомедицинских исследований ВНИЦ РАН и Правительства РСО — Алания, Россия, e-mail: patbiochem@mail.ru

*Гилолаева Лариса Владимировна* — ассистент каф. общественного здоровья, здравоохранения медико-профилактического факультета государственного бюджетного образовательного учреждения ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Минздрава России РСО-Алания, e-mail: sogma.rso@gmail.ru

*Тедтоева Анжелика Ираклиевна* — соискатель отдела патобиохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биомедицинских исследований ВНИЦ РАН и Правительства РСО — Алания, Россия, e-mail: patbiochem@mail.ru

*Маргиева Ольга Ивановна* — ст. лаборант отдела патобиохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биомедицинских исследований ВНИЦ РАН и Правительства РСО — Алания, Россия, e-mail: patbiochem@mail.ru

*Дзугкоева Фира Соломоновна* — д.м.н., проф., зам. директора по НИР Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биомедицинских исследований ВНИЦ РАН и Правительства РСО — Алания, Россия. e-mail: patbiochem@mail.ru

Кузнецова Е.И.

## Нейротоксическое влияние химиотерапии на функции ЦНС у детей с лимфоидными опухолями

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», 115478, Москва, Каширское ш., 24

У детей с лимфоидными опухолями (ЛО) химиотерапия является основным методом лечения. Известно, что химиопрепараты оказывают токсическое влияние на ЦНС и являются фактором, который приводит к существенным когнитивным нарушениям. Цель — поиск нейрофизиологических, нейрохимических, и психологических коррелятов нейротоксичности у детей с ЛО при программной терапии. Обследованы 39 детей (4—16 лет) с ЛО, с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) — 25, с неходжкинской лимфомой (НХЛ) — 14, которые получали лечение по схеме *m-BFM-90*: для больных с ОЛЛ (*mALL-BFM-90*) и НХЛ (*mNHL — BFM-90*). Исследовали ЭЭГ, РЭГ, ЭХО-ЭГ. У 12 детей с ЛО в сыворотке крови определяли уровни молекул средних масс (МСМ) — показатель общей токсичности, *N*-ацетилнейраминовой кислоты (*N*-АНК) — показатель нейротоксичности, малонового диальдегида (МДА) — перекисного окисления липидов, токоферола, ретинола — показателей антиоксидантной защиты, уровня каталазы — свободнорадикального окисления; уровни ванилминдальной кислоты (ВМК) — показателя состояния катехоламинергической системы. Исследования проводили до начала лечения, после индукции ремиссии, после *M*-протокола, после окончания химиотерапии. У 23 детей с ЛО (11—16 лет) в период ХТ, проводили сопоставление ЭЭГ и уровня тревожности (по методике Ч.Д.Спилбергера), «выбора стратегии поведения» (Томаса — Килмана). Группа контроля — здоровые дети того же возраста. До начала лечения у детей с ЛО имелись изменения на ЭЭГ, свидетельствующие об определенной дисфункции дiencephalic структур мозга, и вероятно, обусловлены метаболическими расстройствами, влияющими на нейромедиаторный обмен. Токсическое влияние программной химиотерапии на ЦНС проявлялось по комплексу показателей: по данным ЭЭГ-увеличением значений относительной мощности в полосе  $\delta$ - и  $\Theta$ -диапазона частот, снижением  $\alpha$ -активности, увеличением значений относительной мощности в полосе  $\beta_{1,2}$ ; по данным РЭГ-гемодинамическими нарушениями; увеличением уровней нейрохимических показателей *N*-АНК и ВМК. Это сопровождалось стратегиями поведения «приспособление» и «сотрудничество», не свойственными здоровым ровесникам. Выявлены индивидуальные предикторы развития нейротоксичности при программной химиотерапии у детей с ЛО.

**Ключевые слова:** дети, лимфоидные опухоли, химиотерапия, нейрохимические показатели, психологические тесты, нейротоксичность, электроэнцефалограмма

Kuznetsova E.I.

## Neurotoxic the effects of chemotherapy on the function of the central nervous system in children with lymphoid tumors

FSBSI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», Moscow, Russia 115478, Moscow, Kashirskoye shosse, 24, Russia

**Introduction.** In children with lymphoid tumors (LT) chemotherapy is the main treatment. It is known, that many chemotherapy drugs have toxic effects on the central nervous system and is a factor, that leads to significant cognitive impairment. **Purpose:** Search of neurophysiological, neurochemical, and psychological correlates of neurotoxicity in children with LT when programmed therapy. **Material and methods.** The study included 39 children (4—16 years) with LT, with acute lymphoblastic leukemia (ALL) — 25, with non-Hodgkin's lymphoma (NHL) — 14 who were treated according to the scheme *m-BFM-90*: for patients with ALL (*mALL-BFM -90*) and the NHL (*mNHL — BFM-90*). Investigated the EEG, REG, ECHO EG. In 12 children with LT in blood serum levels of middle molecules (MM) — indicator of general toxicity, *N*-acetylneuraminic acid (*N*-ANA) — indicator of neurotoxicity, malondialdehyde (MDA) — lipid peroxidation, tocopherol, retinol — indicators of antioxidant protection, level of catalase — as free radical oxidation; vanilmandalic acid levels (VMA) — as indicator of the state catecholaminergic system. Studies were performed before treatment, after induction of remission, after *M*-protocol, after the end of chemotherapy. In 23 children (11—16 years) with LT during chemotherapy, performed a comparison of EEG and the level of anxiety (Ch.D.Spilberger), «strategy selection behavior» (Thomas—Kilman). Control group — healthy children of the same age. **Results.** The main results obtained in the present study were that 1) Prior to initiation of treatment of children with LT had a EEG changes, indicating certain dysfunction of diencephalic structures of the brain, and probably due to metabolic disorders that affect

*the neurotransmitter metabolism. 2) Toxic effects of chemotherapy on the CNS program was shown on a range of indicators: according to EEG-increasing values of relative power in the band  $\delta$ - and  $\Theta$ -frequency range, lower  $\alpha$ -activity, increase of relative power in the band beta<sub>1,2</sub>; according to REG-hemodynamic compromise; increasing levels of neurochemical indicators N-ANA and the VMA. This was accompanied by behavior strategies «adaptation» and «cooperation», are not peculiar to healthy peers. Identified individual predictors of neurotoxicity in the software of chemotherapy in children with LT.*

**Key words:** children, lymphoid tumors, chemotherapy, neurochemical indices, psychological tests, neurotoxicity, electroencephalogram

## Введение

У детей с лимфоидными опухолями (ЛО) химиотерапия является основным методом лечения. Однако, известно, что вместе с увеличением выживаемости больных в результате лечения, многие препараты оказывают токсическое влияние на ЦНС [1, 2] и являются фактором, который приводит к существенным когнитивным нарушениям [3]. В основе токсического процесса может лежать повреждение любого структурного элемента нервной системы путем модификации пластического, энергетического обменов, нарушения генерации, проведения нервного импульса, передачи сигнала в синапсах [4]. Опухолевый процесс сопровождается эндогенной интоксикацией, которая действует как нейротоксический компонент, приводит к нарушению нормального функционирования головного мозга. Основным методом оценки функционального состояния мозга является электроэнцефалография (ЭЭГ). Вопрос о связи ЭЭГ-показателей и биохимических характеристик метаболических нарушений у больных с опухолевыми заболеваниями до настоящего времени мало освещен в литературе. Сопоставление ЭЭГ с психологическим статусом позволяет выявить нейробиологические механизмы патологических состояний. Сведения о функциональном состоянии сосудов головного мозга у детей с ЛО в процессе лечения также остаются малоизученной проблемой.

*Цель работы* — поиск нейрофизиологических, нейрохимических, а также психологических коррелятов нейротоксичности у детей с ЛО при программной химиотерапии.

## Методика

Обследовано 39 детей в возрасте от 4 до 16 лет с ЛО, из них с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) — 25, и с неходжкинской лимфомой (НХЛ) — 14 пациентов, которые находились на лечении в отделении химиотерапии гемобластозов НИИ детской онкологии и гематологии ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина». У всех детей установ-

лен диагноз ОЛЛ или НХЛ без поражения ЦНС. Все дети получали противоопухолевое лечение по модифицированной программе mBFM 90 (BFM: Berlin, Frankfurt, Munster): для больных с ОЛЛ (ALL-mBFM 90), и с НХЛ (NHL-mBFM 90), включающей высокие дозы метотрексата МТХ (1—5 г/м<sup>2</sup>), высокие дозы цитозара (2 г/м<sup>2</sup>), антрациклины, ифосфамид, винкристин, L-аспаргиназу, и др., в комбинации с эндолюмбальным введением МТХ (6—12 мг), цитозара (16—30 мг) и преднизолона (4—10 мг) в зависимости от возраста. Программа лечения лимфобластных (из предшественников Т- и В-клеток) и Т-клеточных лимфом идентична программе лечения ОЛЛ.

Для комплексного обследования применяли следующие методы (табл. 1). Запись электроэнцефалограммы (ЭЭГ) проводили с помощью 16-канального микропроцессорного электроэнцефалографа «Нейро-КМ» (Россия). Мостиковые электроды располагали по международной системе «10-20» с референтными электродами на мочке уха. Запись ЭЭГ осуществляли монополярно в состоянии спокойного бодрствования при закрытых глазах. Компьютерную обработку ЭЭГ осуществляли методом преобразования Фурье при помощи программного комплекса «Система анализа и картирования электрической активности головного мозга «Brainsys» (Россия). В анализ включали не менее 12 эпох по 4 с, безартефактной записи ЭЭГ. Проводили эхоэнцефалографию (Эхо-ЭГ) на аппарате ЭЭС-11 с использованием пьезодатчиков 1,76 мГц. Реоэнцефалографию (РЭГ) проводили на реографе 4РГ-2М с применением компьютерной программы записи и анализа. Запись осуществляли в фронтально-мастоидальных (ФМ) и окципитально-мастоидальных (ОМ) отведениях, отражающих состояние мозгового кровообращения в бассейнах внутренних сонных и позвоночных артерий. Оценивали пульсовое кровенаполнение (ПК) А(Ом), периферическое сосудистое сопротивление (ПСС) В/А (%), венозный отток (ВО) (%). В качестве контроля использовали нормативные показатели РЭГ [5].

**Для корреспонденции:** Кузнецова Елена Ивановна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отд-ния нейрохирургического (онкологического) научно-исследовательского института клинической онкологии ФГБНУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», e-mail: kuznetsovaee@mail.ru



Для исследования метаболических нарушений, в экспресс-лаборатории НИИ Клинической онкологии у 12 детей с ЛО определяли уровни нейрохимических показателей. В сыворотке крови определяли концентрацию молекул средних масс (МСМ) как показателя общей токсичности, N-ацетилнейраминаовой кислоты (N-АНК) — нейротоксичности, малонового диальдегида (МДА) — перекисного окисления липидов, ретинола, токоферола — показателей системы антиоксидантной защиты, каталазы — показателя свободнорадикального окисления. В суточной моче определяли уровни ванилиндиальной кислоты (ВМК), как показателя катехоламинергической системы. Группа контроля — 11 практически здоровых детей. Обследования проводили до начала лечения, после индукции ремиссии, после протокола М с применением метотрексата в высоких дозах (1—5 г/м<sup>2</sup>) (всех детей лечили высокими дозами, а данные приведены только для 34 пациентов), и после окончания лечения. В период ХТ, у 23 детей и подростков с ЛО (11—16 лет) проводили сопоставление ЭЭГ с психологическими тестами. Оценивали уровни ситуативной и личностной тревожности по методике Ч.Д.Спилбергера и «выбора стратегии поведения» по методике Томаса—Килмана. Группа контроля — 40 здоровых ровесников, учащихся школ г.Москвы. Клиническое состояние больных оценивали по критериям нейротоксичности NCI-СТС [National Cancer Institute — Common Toxicity Criteria] (версия 3.0).

Результаты спектрального анализа ЭЭГ представляли в виде относительных значений спектральной мощности (Power%), и логарифма относительной мощности (LnRelP), как параметра, имеющего нормальное распределение мощности (закон Гаусса), на заданных стандартных частотных полосах от 1 до 30 Гц, с шагом 1—1,5 Гц. Спектральные параметры ЭЭГ каждого пациента сравнивали с данными ЭЭГ здоровых детей соответствующего возраста и пола из нейрометрического банка ЭЭГ-данных и между собой на этапах лечения. Для статистической обработки

все данные ЭЭГ, РЭГ, параметры нейрохимических показателей, баллы уровня нейротоксичности, показатели психологического тестирования были формализованы с помощью специально разработанного кодификатора и внесены в базу данных, созданную на основе электронных таблиц EXCEL. Данные обрабатывали стандартным пакетом Statistica for Windows v.6.0. Перед проведением процедуры анализа была проведена проверка соответствия распределения эмпирических данных нормальному закону по критерию Колмогорова—Смирнова. Значимость различий между нормально распределенными показателями оценивали по t-критерию Стьюдента для связанных и несвязанных выборок. При сравнении качественных переменных для бинарных признаков использовали точный критерий Фишера или максимального правдоподобия  $\chi^2$ . Проводили корреляционный анализ отдельных физиологических параметров (средних значений нейрохимических показателей, клинического балла нейротоксичности, максимального балла психологического тестирования) с нормализованными спектральными параметрами ЭЭГ от 16 зон коры с использованием критерия Пирсона. Критическое значение уровня значимости при проверке нулевых гипотез (об отсутствии значимых различий) принималось равным 0,05. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде  $M \pm SD$ , где M — среднее, SD — стандартное отклонение.

## Результаты и обсуждение

### Результаты до начала лечения

До начала лечения у 35 из 39 (90%) детей периодически были жалобы на головную боль, преимущественно в лобных областях и слабость.

По данным визуального анализа ЭЭГ у всех 39 детей с ЛО имелись диффузные изменения биоэлектрической активности головного мозга за счет дезорганизации  $\alpha$ -ритма, наличия билатеральных

Таблица 1

Число детей с лимфоидными опухолями, комплексно обследованных методами исследования при диагностике заболевания и на этапах химиотерапии

| Сроки  | Методы                 |                  |                  |                           |                                    |
|--|------------------------|------------------|------------------|---------------------------|------------------------------------|
|  | ЭЭГ (n)                | РЭГ (n)          | Эхо-ЭГ (n)       | Нейрохимические тесты (n) | Психологические тесты (n)          |
| До начала лечения  | 39                     | 12               | 39               | 12                        | —                                  |
| После индукции ремиссии  | 39                     | 12               | 39               | 12                        | —                                  |
| Протокол М (метотрексат в высоких дозах (1—5 г/м <sup>2</sup> )) | 34                     | 11               | 25               | 12                        | 23                                 |
| Окончание лечения  | 28                     | 7                | 14               | 12                        | —                                  |
| Группа контроля  | Здоровые дети (n = 40) | Показатели нормы | Показатели нормы | Здоровые дети (n = 11)    | Здоровые дети (11—16 лет) (n = 40) |

вспышек  $\Theta$ -волн в передних отделах полушарий. У 13 из 39 пациентов (33,3%) были значительные изменения. Отмечалось замедление фоновой активности ЭЭГ, что наблюдали и другие исследователи [6, 7]. Количественный анализ ЭЭГ выявил у детей с ЛО статистически значимое уменьшение показателя относительной мощности в полосах  $\alpha$ - и  $\beta$ -диапазонов ( $p < 0,05$ ) и увеличение значений относительной мощности  $\delta$ - и  $\Theta$ -диапазонов частот в лобно-центральных отведениях по сравнению со здоровыми ровесниками (рис. 1 на 2-й странице обложки). Таким образом, до начала лечения биоэлектрическая активность головного мозга детей с ЛО была изменена и значимо отличалась от таковой у здоро-

вых ровесников. Изменения указывали на определенную дисфункцию диэнцефальных структур мозга, и вероятно, обусловлены метаболическими расстройствами, влияющими на нейромедиаторный обмен.

При исследовании нейрохимических показателей в сыворотке крови имелись признаки интоксикации (существенное повышение уровней МСМ и N-АНК, и снижение уровня токоферола (табл. 2). В связи с тем, что N-АНК входит в состав ганглиозидов [8], и ее уровень увеличивается при деструкции нервной ткани [9], повышение концентрации этого показателя в сыворотке крови у детей с ЛО, является отражением интоксикации опухолевым процессом. Повышен-

Таблица 2

Средние значения нейрохимических показателей у детей с лимфоидными опухолями до начала лечения и в процессе химиотерапии ( $M \pm SD$ )

| Группы                                     | Показатели        |                   |                  |                  |                     |                     |   |
|--|-------------------|-------------------|------------------|------------------|---------------------|---------------------|---|
|  | N-АНК мкмоль/л    | МСМ, усл.ед.      | ВМК, мг/сут.     | МДА, мкмоль/л    | Токоферол, мкмоль/л | Ретинол мкмоль/л    | Каталаза, моль $H_2O_2 \times 10^9$ эр/мл |
| Группа контроля (n = 11)                   | 1,89 $\pm$ 0,26   | 0,86 $\pm$ 0,12   | +                | 3,1 $\pm$ 1,08   | 25,83 $\pm$ 0,47    | 2,95 $\pm$ 0,19     | 37 $\pm$ 8,00                             |
| До начала лечения (n = 12)                 | 2,47 $\pm$ 0,7**  | 1,26 $\pm$ 0,38** | 2,41 $\pm$ 1,26  | 2,49 $\pm$ 0,85  | 17,65 $\pm$ 3,3**   | 2,44 $\pm$ 0,28**   | 37,5 $\pm$ 7,82                           |
| После индукции ремиссии (n = 12)           | 2,73 $\pm$ 0,76** | 0,93 $\pm$ 0,26*  | 3,44 $\pm$ 1,33  | 3,54 $\pm$ 1,33* | 17,57 $\pm$ 2,9**   | 2,05 $\pm$ 0,31* ** | 23,09 $\pm$ 2,97* **                      |
| После Мtx (1–5 г/м <sup>2</sup> ) (n = 12) | 2,16 $\pm$ 0,23** | 0,86 $\pm$ 0,1*   | 3,29 $\pm$ 1,26  | 2,46 $\pm$ 0,73  | 15,82 $\pm$ 3,64**  | 3,02 $\pm$ 0,65*    | 18,30 $\pm$ 1,31* **                      |
| После окончания ХТ (n = 12)                | 3,20 $\pm$ 0,5    | 0,94 $\pm$ 0,1*   | 4,88 $\pm$ 1,37* | 2,75 $\pm$ 1,79  | 16,27 $\pm$ 1,07**  | 3,11 $\pm$ 0,30*    | 48,32 $\pm$ 12,7* **                      |

Примечание. \* — статистически значимые различия с показателями до лечения ( $p < 0,05$ ); \*\* — статистически значимые различия с группой контроля ( $p < 0,05$ ); + — нормы концентрации ВМК в мг/сут.: до 5 лет — 2,20; 6–10 лет — 3,60; 11–15 лет — 4,80

Таблица 3

Средние значения РЭГ-показателей у детей с лимфоидными опухолями до начала лечения и в процессе химиотерапии ( $M \pm SD$ )

| Показатели | Показатели |         | Этапы                     |                                 |   |                            |
|------------|------------|---------|---------------------------|---------------------------------|---|----------------------------|
|            | Отведения  | Сторона | До начала лечения, n = 12 | После индукции ремиссии, n = 12 | После МТХ (1–5 г/м <sup>2</sup> ), n = 11 | После окончания ХТ, n = 11 |
| А (Ом)     | FM         | D       | 0,21 $\pm$ 0,08           | 0,19 $\pm$ 0,10                 | 0,15 $\pm$ 0,68                           | 0,11 $\pm$ 0,04 *          |
|            |            | S       | 0,21 $\pm$ 0,08           | 0,17 $\pm$ 0,06                 | 0,15 $\pm$ 0,07                           | 0,13 $\pm$ 0,04*           |
|            | О M        | D       | 0,17 $\pm$ 0,10           | 0,13 $\pm$ 0,11                 | 0,13 $\pm$ 0,13                           | 0,11 $\pm$ 0,04            |
|            |            | S       | 0,15 $\pm$ 0,07           | 0,12 $\pm$ 0,06                 | 0,09 $\pm$ 0,06 *                         | 0,11 $\pm$ 0,04*           |
| В/А (%)    | FM         | D       | 84,5 $\pm$ 25,5           | 85,16 $\pm$ 14,54               | 71,2 $\pm$ 29,6                           | 79,0 $\pm$ 16,2            |
|            |            | S       | 74,08 $\pm$ 19,3          | 87,16 $\pm$ 10,5                | 80,91 $\pm$ 12,07                         | 68,7 $\pm$ 27              |
|            | О M        | D       | 82,17 $\pm$ 17,32         | 77,5 $\pm$ 33,6                 | 80,36 $\pm$ 27,6                          | 81 $\pm$ 13,1              |
|            |            | S       | 83,75 $\pm$ 12,3          | 72,9 $\pm$ 33,3                 | 74,09 $\pm$ 28,03                         | 76,2 $\pm$ 26,9            |
| ВО (%)     | FM         | D       | 32,16 $\pm$ 19,5          | 44,8 $\pm$ 22,8                 | 19,9 $\pm$ 44,05                          | 33,4 $\pm$ 22              |
|            |            | S       | 17,08 $\pm$ 32,16         | 33,5 $\pm$ 23,6                 | 21,8 $\pm$ 23,23                          | 25,4 $\pm$ 11,2            |
|            | О M        | D       | 48 $\pm$ 35,2             | 39,08 $\pm$ 28,5                | 32,18 $\pm$ 19,8                          | 50 $\pm$ 25,2              |
|            |            | S       | 15,5 $\pm$ 28,6           | 20,8 $\pm$ 18,6                 | 21,09 $\pm$ 17,9                          | 31 $\pm$ 18,9              |

Примечание. \*  $p < 0,05$  — статистически значимые различия по сравнению с началом лечения

ный уровень МСМ отмечался только до начала лечения (табл. 2). При сопоставлении нейрохимических и ЭЭГ-показателей, полученных до начала лечения, обнаружена обратная зависимость между повышением концентрации МСМ (интоксикации) и снижением значений относительной мощности в полосе  $\alpha$ -ритма (9—10 Гц) ( $R = -0,63$ ;  $p < 0,05$ ). Связь отражала токсическое влияние опухолевого процесса на функции ЦНС.

По данным РЭГ, до начала лечения у 10 из 12 пациентов (83%) были признаки замедления венозного оттока (ВО), у 2 из 12 (17%) — незатрудненного ВО. У 3 из 12 пациентов (33%) отмечалось снижение ПК. У 7 из 12 пациентов (58%) — повышение ПСС, у 2 из 12 пациентов (17%) — признаки неустойчивости сосудистого тонуса. В табл. 3 показано, что до начала лечения средние значения ВО в бассейнах правой внутренней сонной и позвоночной артерий превышали нормативные.

По данным ЭХО-ЭГ, у 14 из 39 пациентов (36%) имелись признаки гипертензии головного мозга. На это указывали расширение III желудочка и усиление эхо-пульсации до 60%.

#### *Результаты в период химиотерапии*

После индукции ремиссии у 9 из 39 больных (23%) отмечали положительную динамику на ЭЭГ, у 11 из 39 (28%) — динамики не было. У 19 из 39 пациентов (49%) была отрицательная динамика за счет увеличения амплитуды билатеральных всплесков  $\delta$ - и  $\Theta$ -волн (3—5 Гц) амплитудой 120 мкВ. Количественный анализ ЭЭГ после индукции ремиссии, по сравнению с началом лечения, выявил значимое увеличение относительной мощности в полосе  $\Theta$ -диапазона (4—6 Гц) в лобно-центральных областях (рис. 2 на 2-й странице обложки). Нарастание мощности  $\Theta$ -частот (4—6 Гц) в лобно-центральных областях можно расценивать, как проявления токсического влияния химиотерапии на функции ЦНС. «Наличие  $\Theta$ -активности в сенсомоторных зонах полушарий указывает на дисфункцию лобных отделов коры головного мозга и коррелирует со снижением памяти и внимания у детей» [10].

При анализе нейрохимических показателей на фоне ХТ, после индукции ремиссии уровни МСМ снижались до нормальных значений (табл. 2). Это сопровождалось улучшением самочувствия детей. Однако нарастали признаки нейротоксичности: сохранялся повышенный уровень N-АНК, существенно повышались уровни МДА, и снижались уровни ретинола, токоферола и каталазы. В процессе ХТ, с одной стороны уменьшалась интоксикация, связанная с опухолевым процессом, а с другой — нарастало токсическое влияние ХТ на ЦНС. Количественный ана-

лиз ЭЭГ после применения МТХ в высоких дозах (1—5 г/м<sup>2</sup>) выявил значимое нарастание относительной мощности в полосе  $\beta_1$  и  $\beta_2$  (17—21 Гц) в теменно-затылочных областях при уменьшении  $\alpha$ -активности. При нейрохимическом исследовании в этот период отмечали увеличение уровней N-АНК и ВМК ( $p < 0,05$ ), и снижение концентрации каталазы (табл. 2).

#### *Связи нейрохимических и ЭЭГ-показателей*

После индукции ремиссии обнаружена обратная зависимость между уменьшением уровня МСМ (интоксикации) и увеличением значений  $\Theta$ -активности в лобно-центральных областях ( $R = -0,76$ ;  $p = 0,03$ ). Выявлена обратная зависимость между повышенным уровнем N-АНК и значениями относительной мощности в полосе  $\alpha_2$  (10—11 Гц) в теменно-затылочных областях ( $R = -0,79$ ;  $p < 0,05$ ), и прямая зависимость — со значениями относительной мощности в полосе  $\beta_1$  диапазона (18—19,5 Гц) в теменно-затылочных областях ( $R = 0,88$ ;  $p < 0,01$ ). Обнаружена обратная зависимость между уровнем ВМК и уменьшением значений относительной мощности в полосе  $\alpha_1$  диапазона (7,5—9 Гц) в теменно-затылочных областях ( $R = -0,83$ ;  $p < 0,05$ ) и прямая зависимость — с повышением относительной мощности  $\beta_1$  активности ( $R = 0,89$ ;  $p < 0,05$ ). После введения МТХ в высоких дозах (1—5 г/м<sup>2</sup>) выявлены корреляции между повышением уровня N-АНК и  $\beta_1$  (18—19 Гц) ( $R = 0,81$ ;  $p < 0,05$ ) и  $\beta_2$  (20—22 Гц) ( $R = 0,55$ ;  $p < 0,01$ ). Обнаружена прямая зависимость между повышением уровня ВМК и  $\beta_1$ - ( $R = 0,93$ ;  $p < 0,01$ ) и  $\beta_2$ -активности ( $R = 0,88$ ;  $p < 0,01$ ).

период ХТ обнаружены взаимосвязи между нейрохимическими показателями N-АНК (нейротоксичности) и ВМК (стресса) и повышенным содержанием  $\beta_1$ - и  $\beta_2$ -активности в теменно-затылочных областях и дефицитом активности альфа-частот. При высоких значениях этих показателей изменялось соотношение низко- и высокочастотных компонентов  $\alpha$ -ритма, с преобладанием последних, что указывало на «снижение уровня психофизиологической пластичности» [11]. Снижение мощности в  $\alpha$ -полосе частот и увеличение значений мощности  $\beta$ -диапазона, возможно, связано с повышенной активацией подкорковых структур на фоне снижения функциональной активности префронтальной коры под влиянием химиотерапии.

В период ХТ у 32 из 39 пациентов (82%) возникли клинические проявления центральной нейротоксичности: головная боль, агрессивность, раздражительность. После индукции ремиссии выявлена корреляция между клиническим баллом нейротоксических

проявлений и значениями относительной мощности в полосе  $\Theta$ -диапазона (4—6 Гц) в лобно-центральных областях ( $R = 0,58$ ;  $p < 0,05$ ). После применения МТХ в высоких дозах (1—5 г/м<sup>2</sup>) обнаружена корреляция между клиническим баллом нейротоксичности и увеличением значений логарифма относительной мощности в полосе  $\beta_1$ - и  $\beta_2$ -диапазонов (17—21 Гц) в теменно-затылочных областях ( $R = 0,61$ ;  $p < 0,05$ ).

По данным ЭХО-ЭГ, у 19 из 39 детей с ЛО (49%) после индукции ремиссии выявлены признаки внутричерепной гипертензии головного мозга. Отмечалось расширение III желудочка и усиление эхо-пульсации до 60—70%. «Нарушение оттока крови от головного мозга до начала лечения, скорее всего, связано со сдавлением венозных сосудов увеличенными лимфатическими узлами, что приводит к гипертензии головного мозга. Во время ХТ гипертензия мозга связана с введением цитозара, преднизолона, МТХ в высоких дозах. Преднизолон/дексаметазон способствуют секреции антидиуретического гормона, задержке Na и воды в организме» [12]. По данным РЭГ, у детей с ЛО после применения МТХ в высоких дозах (1—5 г/м<sup>2</sup>) значительно снижалось пульсовое кровенаполнение в бассейнах позвоночных артерий (табл. 3).

При исследовании уровня тревожности у детей и подростков (11—16 лет) с ЛО в период ХТ оказалось, что повышенный уровень ситуативной тревожности по методике Спилбергера был значительно выше уровня показателя в группе здоровых (37,5% и 15% соответственно) [13]. Обнаружена корреляция между уровнем ситуативной тревожности и мощностью бета2-активности в лобно-височных отделах правого полушария ( $R = 0,59$ ;  $p < 0,05$ ). При исследовании «выбора стратегии поведения» Томаса—Килмана стратегию «приспособление» выбирали 32% пациентов и 13% здоровых. Здоровые дети и подростки чаще всего выбирали стратегию «соперничество» — в 50% наблюдений, а пациенты с ЛО — только в 25% наблюдений. Стратегию «сотрудничество» — 11% больных, а здоровые подростки не выбирали эту стратегию. При исследовании корреляции между показателями ЭЭГ и выбором стратегии «сотрудничество» оказа-

лось, что этот выбор определялся состоянием ЦНС в связи с токсическим влиянием ХТ. По нашим данным, токсическое влияние ХТ на ЦНС проявлялось обратной зависимостью между показателем нейротоксичности (N-АНК) и снижением значений относительной мощности в полосе  $\alpha$ -диапазона (10—11 Гц) ( $R = -0,79$ ) и прямой зависимостью между N-АНК и увеличением в полосе  $\beta_1$  в теменно-затылочных областях ( $R = 0,88$ ). Точно такие же корреляции обнаруживали у пациентов, выбирающих стратегию «сотрудничество». Таким образом, у детей и подростков с ЛО в период ХТ выбор стратегий поведения коррелировал с функциональным состоянием ЦНС.

В результате комплексного исследования у детей с ЛО во время химиотерапии обнаружены признаки нейротоксичности на нейрохимическом, нейрофизиологическом и психологическом уровнях. При увеличении показателей нейротоксичности (N-АНК) и стресса (ВМК) происходило увеличение значений  $\delta$ - и  $\Theta$ -активности, снижение  $\alpha$ -активности и повышение  $\beta_1$ - и  $\beta_2$ -активности, что проявлялось повышением уровня «тревожности», и стратегиями поведения, не свойственными здоровым ровесникам. Выявлены индивидуальные предикторы возможного развития нейротоксичности при программной ХТ у детей и подростков с ЛО (табл. 4).

Таким образом, опухолевый процесс и химиотерапия оказывают существенное негативное влияние на функции ЦНС детей и подростков с лимфоидными опухолями. У детей с ЛО уже до начала лечения имелись выраженные нарушения функционального состояния головного мозга в связи с опухолевым процессом. Токсическое влияние программной химиотерапии на ЦНС проявлялось нейрофизиологическими, нейрохимическими, гемодинамическими нарушениями, повышенным уровнем тревожности и отклонениями поведения. Исследования могут помочь клиницистам в выявлении пациентов, которым необходима своевременная коррекция возникающих нарушений при проведении противоопухолевого лечения. Неспецифические ЭЭГ-маркеры могут быть использованы как предикторы нейротоксичности при различных заболеваниях, где применяются лекарственные методы лечения.

Таблица 4

Индивидуальные нейробиологические критерии нейротоксичности и ее предикторы у детей с лимфоидными опухолями при программной химиотерапии

| Показатели      | ЭЭГ  | РЭГ                                 | Нейрохимические                                      | Психологические                                 |
|-----------------|--|-------------------------------------|--|---|
| Предикторы НТ * | ↓ Power% альфа- и бета-;<br>↑ Power% дельта- и тета-<br>3—5 Гц           | ↑ ВО (замедление венозного оттока)  | ↑ МСМ, N-АНК;<br>↓ ретинол, токоферол                | —   |
| Корреляты НТ    | ↑ Power% тета- (FC) и<br>↓ Power% альфа- (PO);<br>↑ Power% бета1,2- (CP) | ↑ ВО и ↑ В/А(%);<br>↓ ПК и ↓ В/А(%) | ↑ N-АНК, ВМК;<br>↓ ретинол, токоферол,<br>↓ каталаза | ↑ Ситуативная тревожность, нарушения поведения* |

Примечание. \* — статистически значимые различия по сравнению со здоровыми ( $p < 0,05$ )

## Список литературы

1. Malhotra A1, Welte FJ. Methotrexate-related neurotoxicity. *Pediatr Radiol.* 2010;40 Suppl 1:S174.
2. Sioka C, Kyritsis AP. Central and peripheral nervous system toxicity of common chemotherapeutic agents. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009;63(5):761-7.
3. Lofstad GE1, Reinfjell T, Hestad K, Diseth TH. Cognitive outcome in children and adolescents treated for acute lymphoblastic leukaemia with chemotherapy only. *Acta Paediatr.* 2009;98(1):180-6.
4. Куценко С.А. Основы токсикологии. СПб., Фолиант; 2004. 395с.
5. Соколова И.В., и др. Оценка функционального состояния сосудов головного мозга методом двухкомпонентного анализа реоэнцефалограммы: Методические рекомендации. М.;1987: 24с.
6. Goldberg-Stern H, Cohen R, Pollak L, Kivity S, Eidlitz-Markus T, Stark B, Yaniv I, Shuper A. The mystery of electroencephalography in acute lymphoblastic leukemia. *Seizure.* 2011;20(3):194-6.
7. Korinthenberg R, Scheuring B, Boos J, Niemeyer C. On the origin of EEG-slowing and encephalopathy during induction treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol.* 2002;39(6):566-72.
8. Строев Е.А., ред. Патобиохимия. М.; ГОУ ВУНМЦ.2002.233с.
9. Камышников В.С., ред. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике (2-е изд., перераб. и доп.) М.; 2004.: 911с.
10. Горбачевская Н.Л. Особенности формирования ЭЭГ у детей в норме и при разных типах общих (первазивных) расстройств развития: Дис...д-ра биол. наук. М.; 2000. 261с.
11. Панюшкина С.В. Электроэнцефалографические закономерности динамики нейромедиаторных процессов у больных с невротическими расстройствами: Дис... д-ра мед. наук. М.; 2000. 307 с.
12. Румянцев А.Г., ред. Сопроводительная терапия и контроль инфекции при гематологических и онкологических заболеваниях. М.: Медпрактика; 2006.503с.
13. Кузнецова Е.И., Филатова Е.Н., Горбачевская Н.Л., Шестопалова И.М. Психонейрофизиологическое состояние подростков (11-16лет) с гемобластомами в процессе химиотерапии. *Детская онкология.* 2006;1: 20-4.
3. Lofstad GE1, Reinfjell T, Hestad K, Diseth TH. Cognitive outcome in children and adolescents treated for acute lymphoblastic leukaemia with chemotherapy only *Acta Paediatr.* 2009;98(1):180-6.
4. Kutsenko S. A. *Osnovy toksikologii (Basics of Toxicology)*, SPb.; 2004: 395p. (in Russian)
5. Sokolova I.V. Otsenka funktsionalnogo sostoyaniya sosudov golovnogo mozga metodom dvuhkomponentnogo analiza reoentsefalogrammy: Metodicheskie rekomendatsii (*Evaluation of the functional state of the cerebral vessels by the two-component analysis reoencephalogram: Guidelines*). Moscow.; 1987: 24p. (in Russian)
6. Goldberg-Stern H, Cohen R, Pollak L, Kivity S, Eidlitz-Markus T, Stark B, Yaniv I, Shuper A. The mystery of electroencephalography in acute lymphoblastic leukemia. *Seizure.* 2011;20(3):194-6.
7. Korinthenberg R, Scheuring B, Boos J, Niemeyer C. On the origin of EEG-slowing and encephalopathy during induction treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol.* 2002 Dec;39(6):566-72
8. Stroev E.A., red. *Patobiokhimiya (Patobiokhimiya editon)*, Moscow GOU VUNMTs. 2002 233p. (in Russian)
9. Kamyshnikov V.S., red. *Spravochnik po kliniko-biokhimiicheskim issledovaniyam i laboratornoy diagnostike* (2-e izd., pererab. i dop.) (*Directory of clinical and biochemical research and laboratory diagnosis (2nd ed., Rev. and additional)*) Moscow.; 2004 911p. (in Russian)
10. Gorbachevskaya N.L. Osobennosti formirovaniya EEG u detey v norme i pri raznykh tipah obschih (pervazivnykh) rasstroystv razvitiya: Doctor's thesis (*Features of formation of the EEG in children in norm and in various types of general (pervasive) developmental disorders: Dis...Dr.s of biology sciences*. Moscow; 2000: 261p. (in Russian)
11. Panyushkina S.V. *Elektroentsefalograficheskie zakonomernosti dinamiki neyromediatornykh protsessov u bolnykh s nevroticheskimi rasstroystvami*: Doctor's thesis (*Electroencephalographic patterns of neurotransmitter dynamics processes in patients with neurotic disorders: Dis...Dr.s of medical sciences*. Moscow, MSU; 2000. 307 p. (in Russian)
12. Rumyantsev A.G., red. *Soprovoditelnaya terapiya i kontrol infektsii pri gematologicheskikh i onkologicheskikh zabolevaniyakh* (*Accompanying therapy and control of infection in hematology and oncology*) Moscow: Medical Practice; 2006: 503p. (in Russian)
13. Kuznetsova E.I., Filatova E.N., Gorbachevskaya N.L., Shestopalova I.M. Psihoneyrofiziolicheskoe sostoyanie podrostkov (11-16 let) s gemoblastozami v protsesse himioterapii (A psychoneurophysiological state of children (11-16 years) with gemoblastoses during chemotherapy). *Pediatric oncology.* 2006; 1: 20-4. (in Russian)

## References

1. Malhotra A1, Welte FJ. Methotrexate-related neurotoxicity. *Pediatr Radiol.* 2010;40 Suppl 1:S174.
2. Sioka C, Kyritsis AP. Central and peripheral nervous system toxicity of common chemotherapeutic agents. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009;63(5):761-7.

Поступила 13.05.14  
Received 13.05.14

Гильяно Н.Я.<sup>2</sup>, Бондарев Г.Н.<sup>2</sup>, Коневега Л.В.<sup>2</sup>,  
Носкин Л.А.<sup>2</sup>, Журишкина Е.В.<sup>2</sup>, Алчинова И.Б.<sup>1</sup>

## **Возможные механизмы селективного действия ингибиторов гликолиза на эндотелиоциты и клетки карциномы человека в культуре**

<sup>1</sup> — ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

<sup>2</sup> — НИЦ «Курчатовский институт», ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П.Константинова», 188300, Гатчина, Ленинградская обл., Орлова роща

*Известно, что продукция энергии и синтез макромолекул в опухолевых клетках зависят от метаболизма глюкозы в большей степени, чем в неопухолевых. Проведено сравнительное исследование эффективности ингибиторов гликолиза 2-дезоксид-Д-глюкозы (2-DG) и натриевой соли дихлоруксусной кислоты (DCA) в индукции гибели клеток, нарушении прогрессии клеток по циклу и изменений внутриклеточного уровня кислородных радикалов в эндотелиоцитах (линия ECV304) и клетках карциномы человека (линия HeLa G-63). Показано, что ингибирование различных стадий гликолиза приводит к нарушению пролиферации и к гибели только клеток HeLa G-63. Ингибитор киназы пируват дегидрогеназы DCA и 2-DG, ингибитор транспорта глюкозы и процесса гликозилирования, индуцировали дозозависимый селективный цитотоксический эффект. Увеличение внутриклеточного уровня кислородных радикалов, индуцируемое DCA, в клетках HeLa G-63 предполагает, что цитотоксический эффект DCA опосредован активацией митохондриальных функций. Зависимость цитотоксического эффекта 2-DG от уровня глюкозы в питательной среде позволяет предположить, что не только окислительный стресс, но и энергетическое голодание вовлечены в этот процесс.*

**Ключевые слова:** 2-дезоксид-Д-глюкоза (2-DG), натриевая соль дихлоруксусной кислоты (DCA), активные формы кислорода (АФК), ECV304, HeLa G-63, проточная цитометрия

Giliano N.Y., Bondarev G.N., Konevega L.V., Noskin L.A., Zhurishkina E.V., Alchinova I.B.

## **Possible mechanism of the selective action of the inhibitors of glycolysis in the endothelial cells and the human carcinoma cells in the culture**

FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology» NRC «Kurchatov Institute»,

FBSI «B.P.Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute»

*It is known that the production of energy and synthesis of macromolecules in cancer cells depend on the glucose metabolism to a greater extent than in non-tumor. In this paper we carry out a comparative study of the effectiveness of the two modifiers glycolysis 2 — D-deoxyglucose (2-DG) and dichloroacetate (DCA) in the induction of the cell death, changes in the cell cycle progression and in the alteration of the intracellular ROS levels in endothelial cells (line ECV304) and human carcinoma cells (line HeLa G-63) in order to identify cause-effect relations between these events. It has been shown that inhibition of the various stages of the glycolysis result in blocking cells in G2/M phase of the cell cycle and the induction of the cell death. This effect was record for HeLa G-63 cells only. DCA is inhibitor of the pyruvate dehydrogenase kinase and 2-DG is inhibitor of the glucose transport and glycosylation induced selective dose-dependent cytotoxic effect in HeLa G-63 cells. The increase of intracellular levels of the oxygen radicals induced by DCA in the cells HeLa G-63 suggests that the cytotoxic effect of the DCA is mediated by activation of the mitochondrial functions. The cytotoxic effect of 2-DG depend on the level of glucose in the culture medium, therefore we suggest that not only the oxidative stress, but and the energy depletion involved in selective response of the cancer cells on the actions of the inhibitors of glycolysis.*

**Key words:** 2-D-deoxyglucose (2-DG), sodium dichloroacetate (DCA), reactive oxygen spices, ECV304, HeLa G-63, flow cytometry

Малигнантная трансформация клетки сопровождается рядом метаболических изменений, в том числе и аэробным гликолизом, который может быть следствием нарушения митохондриального дыхания из-за митохондриальных дефектов, адаптации к гипоксическому окружению, онкогенных сигналов и нарушения экспрессии метаболических ферментов [1, 2]. Несмотря на гетерогенность клеток в опухолях, почти все опухолевые клетки демонстрируют усиленное включение и утилизацию глюкозы, в то время как митохондриальная активность в них в значительной степени подавлена [3]. Первая стадия гликолиза — это фосфорилирование 6-го углерода глюкозы гексокиназой. Известно, что глюкозный аналог 2-DG конкурирует с глюкозой как за транспорт в клетку, так и за сайт связывания с гексокиназой [4]. При фосфорилировании 2-DG образуется 2-DG-6P, который аккумулируется в клетке и нарушает конвертирование 2-D-глюкозо-6-фосфата в 2-D-фруктозо-6-фосфат. Ингибирование 2-DG этой стадии гликолиза вызывает истощение внутриклеточного уровня АТФ, блокирование прогрессии по клеточному циклу и гибель клеток *in vitro* [5]. Следует отметить гетерогенность эффектов 2-DG в различных опухолях [6], и пока остается не выясненной взаимосвязь между усилением гликолиза и апоптотической гибелью клеток. Однако изменения в редоксном статусе, обусловленные снижением регенерации NADH и лактата из-за ингибирования гликолиза, предполагают запуск апоптоза [7]. К тому же показано, что 2-DG может селективно убивать опухолевые клетки как при аэробных условиях (через ингибирование процесса гликозилирования), так и при гипоксии (через ингибирование гликолиза) [4]. Последняя стадия гликолиза — это индукция киназы пируватдегидрогеназы (PDK), которая приводит к инактивации пируватдегидрогеназного комплекса (PDC). PDC катализирует необратимое декарбоксилирование пирувата до ацетил-CoA, CO<sub>2</sub> и NADH [8].

Обработка опухолевых клеток DCA, ингибитором киназы пируватдегидрогеназы, увеличивала окисление глюкозы и понижала уровень лактата. Поскольку окисление глюкозы происходит в митохондриях, предполагают, что митохондрии опухолевых клеток, возможно, функционально подавлены, а не окончательно повреждены, что позволяет рассматривать препараты, подобные DCA, в качестве новых противоопухолевых агентов [9]. DCA также индуцировал митохондриально-зависимый апоптоз и снижал пролиферацию как *in vitro*, так и *in vivo* [10]. Способность DCA менять гликолитический фенотип в опухолевых клетках через ингибирование киназы пируватдегидрогеназы приводит к снижению выживаемости опухолевых клеток и роста опухоли. Торможение

роста опухоли некоторые исследователи объясняют увеличением апоптотической гибели клеток после обработки DCA [10—12]. Ряд авторов считает, что DCA действует больше как цитостатический агент, а не цитотоксический [13, 14]. Предполагается, что DCA активирует окислительное фосфорилирование и способствует апоптотической гибели по двум механизмам. Первый — увеличение потока через электронную транспортную сеть, приводящее к деполяризации митохондриальной мембраны и высвобождению апоптотического эффектора — цитохрома С. Второй — увеличение генерации АФК и активация вольтажзависимого K<sup>+</sup>-ионного канала, что приводит к утечке ионов калия и активации каспаз [15].

*Цель исследования* — изучение эффективности ингибиторов гликолиза 2-DG и DCA в индукции гибели клеток, нарушении прогрессии клеток по циклу и изменений внутриклеточного уровня АФК в эндотелиоцитах (линия ECV304) и клетках карциномы человека (линия HeLa G-63).

### Методика

Работа выполнена на модельной системе, состоящей из двух клеточных линий человека, одна из которых опухолевая (HeLa G-63), а вторая перевиваемая, трансформированная (ECV 304), но сохранившая некоторые характеристики исходной эндотелиальной линии. Клетки культивировали на среде Игла с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки. В качестве антибиотика использовали гентамицин. Клетки выращивали в пенициллиновых флаконах с покровными стеклами, что позволяло одновременно проводить морфологический и цитометрический анализ одной и той же популяции клеток. Клетки, выращенные на покровных стеклах, фиксировали этанолом, затем окрашивали ацетоорцеином и анализировали на световом микроскопе «Motic», снабжённом цифровой фотокамерой. На стёклах регистрировали клетки с характерными для апоптоза морфологическими признаками. Клетки, выросшие на поверхности флаконов, снимали раствором Версена, полученную клеточную суспензию центрифугировали и осадок суспендировали в растворе, содержащем 0,1% бромистого этидия, за 15 мин до анализа на цитометре и без последующей отмывки красителя для оценки распределения клеток по содержанию ДНК.

Внутриклеточный уровень активных форм кислорода (АФК) регистрировали цитометрически с помощью флуоресцентного красителя 2',7'-дихлорфлуоресцина диацетата (DCFH-DA). Клетки инкубировали в среде, содержащей 20 мкМ DCFH-DA, в течение 15 мин при 37°C. DCFH-DA конвертируется с помощью внутриклеточной эстеразы до 2,7-дихлорфлуоресцина (DCFH). В присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или дру-

гих оксидантов DCFH окисляется до высокофлуоресцентного 2,7-дихлорфлуоресцеина (DCF,  $\lambda_{em} = 535$  нм, зелёная флуоресценция). После инкубации с красителем клетки дважды отмывали в холодном фосфатном буфере и далее измеряли на проточном цитометре. Для детекции внутриклеточного аниона супероксида использовали дигидроэтидин (DHE), окисленная форма которого имеет максимум эмиссии при  $\lambda_{em} = 590-610$  нм, (красная флуоресценция). Клеточную суспензию инкубировали в темноте с DHE (конечная концентрация 5–10 мкМ), в течение 30 мин при 37°C, а затем анализировали на проточном цитометре.

В качестве ингибиторов гликолиза использовали 2-DG (Sigma, USA) и натриевую соль дихлоруксусной кислоты (DCA), синтезированную в лаборатории биоорганической и медицинской химии Бондаревым Г.Н.

Цитометрический анализ проводили на проточном цитометре, созданном в группе радиобиологии и медицины ПИЯФ [16]. Анализ гистограмм (процентное отношение клеток с различным содержанием ДНК к общему числу проанализированных клеток) проводили с помощью компьютерной программы (созданной сотрудником ПИЯФ РАН Н.В.Клоповым), которая является модифицированной формой известной программы Dean [17]. В каждом случае анализировали не менее 20 тыс. клеток. Эксперимент повторяли не менее 5 раз.

Статистическая обработка результатов проводилась в программе Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, США).

### Результаты и обсуждение

Цитометрический анализ распределения клеток по содержанию ДНК позволяет проследить как за прогрессией клеток по циклу: 2с- G<sub>1</sub>; 3с- S; 4с- G<sub>2</sub>/M, так и оценить цитотоксичность препаратов: клетки с гиподиплоидным содержанием ДНК (<2с) или sub-G<sub>1</sub>-популяцию идентифицируют как апоптоз

[18]. В серии экспериментов клетки ECV304 и HeLa G-63 были рассеяны по пенициллиновым флаконам в концентрации  $5 \times 10^5$  в 1 мл. Через 24 ч в питательную среду были добавлены либо DCA, либо 2-DG в концентрациях 20, 40, 80 мМ, после чего клетки культивировали еще 48 ч. Выбор концентраций и продолжительности обработки были обусловлены результатами других исследований, согласно которым 48-часовая инкубация клеток с DCA в концентрации 17 мМ не индуцировала апоптотическую гибель клеток, а при увеличении концентрации до 25 мМ и выше апоптоз регистрировался, но отсутствовала селективная гибель опухолевых клеток [13]. В таблице представлены результаты пяти независимых экспериментов по оценке влияния различных концентраций ингибиторов гликолиза на распределение клеток ECV 304 и HeLa G63 по содержанию ДНК.

Как видно из таблицы, в контроле существенных различий между клеточными линиями как в спонтанном уровне клеток с гиподиплоидным содержанием ДНК ECV 304, HeLa G-63, так и в скорости прогрессии по циклу (% соотношение распределения клеток по фазам клеточного цикла) не наблюдается. Инкубация клеток в течение 48 ч в среде с различными концентрациями DCA и 2-DG индуцировала дозозависимое увеличение доли клеток с гиподиплоидным содержанием ДНК только в линии HeLa G63. При всех использованных концентрациях этих ингибиторов регистрировалась селективная цитотоксичность в отношении клеток карциномы человека. Ингибиторы меняли также и распределение клеток HeLa G-63 по фазам клеточного цикла. С увеличением концентрации существенно снижается доля клеток в G<sub>1</sub>-фазе(2с) и увеличивается доля sub-G<sub>1</sub>(<2с) фракции, из чего можно предположить, что ингибиторы нарушают прогрессию клеток из G<sub>1</sub> в S-фазу. Мы проверили это предположение, оценив распределение клеток по содержанию ДНК в различные сроки после посева. Флакон Карреля с монослоем клеток HeLa G63 и ECV 304 был рассеян по пенициллиновым

Таблица

| Содержание ДНК | Линия клеток           |                         |            |                      |                        |                         |            |                      |
|----------------|------------------------|-------------------------|------------|----------------------|------------------------|-------------------------|------------|----------------------|
|                | ECV 304                |                         |            |                      | HeLa G63               |                         |            |                      |
|                | <2с Sub-G <sub>1</sub> | 2с G <sub>1</sub> -фаза | 3с S-фаза  | 4с G <sub>2</sub> /M | <2с Sub-G <sub>1</sub> | 2с G <sub>1</sub> -фаза | 3с S-фаза  | 4с G <sub>2</sub> /M |
| Контроль       | 5,9 ± 1,5              | 56,6 ± 3,9              | 13,6 ± 3,1 | 24,6 ± 2,4           | 6,8 ± 2,7              | 58,2 ± 5,8              | 11,3 ± 3,4 | 23,4 ± 4,5           |
| DCA 20 мМ      | 7,7 ± 1,6              | 56,9 ± 6,6              | 13,2 ± 3,7 | 23,6 ± 6,1           | 17,9 ± 4,1             | 52,5 ± 12,3             | 9,8 ± 0,5  | 19,8 ± 6,5           |
| 40 мМ          | 8,8 ± 3,6              | 54,7 ± 4,9              | 13,8 ± 4,5 | 22,7 ± 5,6           | 51,5 ± 9,8             | 27,0 ± 8,6              | 6,0 ± 1,0  | 15,5 ± 2,5           |
| 80 мМ          | 15,8 ± 3,9             | 48,6 ± 6,7              | 13,0 ± 3,4 | 22,6 ± 4,9           | 86,0 ± 5,6             | 7,7 ± 2,4               | 3,2 ± 1,2  | 3,1 ± 1,3            |
| 2D-G 20 мМ     | 5,2 ± 1,5              | 65,2 ± 6,1              | 12,1 ± 3,4 | 17,5 ± 5,5           | 12,2 ± 2,1             | 59,0 ± 4,3              | 9,8 ± 0,6  | 19,0 ± 5,3           |
| 40 мМ          | 9,3 ± 2,6              | 58,5 ± 5,3              | 10,5 ± 1,5 | 21,7 ± 2,1           | 24,8 ± 2,5             | 49,6 ± 5,7              | 9,8 ± 2,1  | 15,8 ± 3,6           |
| 80 мМ          | 7,3 ± 2,1              | 59,7 ± 3,4              | 8,3 ± 2,3  | 23,9 ± 4,1           | 41,8 ± 2,9             | 37,7 ± 2,1              | 7,8 ± 3,1  | 12,7 ± 2,9           |



флаконам с покровными стеклами, и через 3 ч после посева в питательную среду был добавлен либо DCA, либо 2-DG в концентрации 40 мМ. Часть клеток фиксировали через 24 ч после инкубации с ингибиторами, а часть через 48 ч. Из гистограмм, представленных на рис. 1, видно, что 24-часовая обработка клеток HeLa G63 с 40 мМ DCA (А) и 40 мМ 2-DG (В) не увеличивала sub-G<sub>1</sub>(<2с) фракцию, но индуцировала аккумуляцию клеток в G<sub>2</sub>/M фазах клеточного цикла. Через 48 часов (Б и Г) инкубации клеток блок G<sub>2</sub>/M исчезает, но увеличивается sub-G<sub>1</sub>(<2с) фракция, что позволяет предположить, что DCA и 2-DG индуцирует необратимое блокирование пролиферации в G<sub>2</sub>/M, которое приводит к гибели клетки. На клетках ECV 304 блокирование пролиферации не зарегистрировано (Д и Ж).

Параллельный морфологический анализ, выполненный на клетках, выросших на покровных стеклах, выявил клетки с характерными для апоптоза морфологическими признаками (конденсация хроматина и фрагментация ядер). Наши результаты согласуются с данными, полученными на клетках колоректального рака [19]. Авторы показали, что после обработки клеток 20 мМ DCA наблюдалось значительное снижение пролиферации, которое было ассоциировано с апоптотической гибелью и остановкой клеток в G<sub>2</sub>/M фазе клеточного цикла. Для неканцерогенных клеток этот эффект DCA отсутствовал. Очевидно, что цитотоксичность DCA для опухолевых клеток частично может быть обусловлена и его цитостатическим эффектом. Предполагается, что ингибирование киназы пируватдегидрогеназы DCA с последующей активацией митохондрий приводит к повышению внутриклеточного уровня АФК [15].

Используя два флуоресцентных зонда, пероксид-чувствительный 2,7- DCFH-DA и супероксид-чувствительный DHE, мы оценили влияние DCA на внутриклеточный уровень АФК в клетках ECV 304 и HeLa G63. Ранее нами было показано, что эти клеточные линии различаются по внутриклеточному уровню оксида азота (NO). В клетках ECV-304, экспрессирующих конститутивную изоформу NO-синтазы, он был ниже, чем в клетках HeLa G63, экспрессирующих индуцибельную изоформу NOS. Мы предположили, что различия в базальном внутриклеточном уровне NO определяют клеточные ответы на действие агентов, модифицирующих уровень свободных радикалов (ингибиторы NO-синтазы или антиоксиданты) в этих клеточных линиях [20—22]. На рис. 2 представлены гистограммы одного из пяти экспериментов по оценке внутриклеточного уровня АФК. При инкубировании клеток HeLa G-63 как с DHE (А), так и с DCFH-DA(Б) интенсивность флуоресценции была значительно больше,

чем в клетках ECV 304. Пик флуоресценции клеток HeLa G63 был на 20-м канале, а ECV 304 на 6-м-8-м каналах. Обработка клеток DCA в концентрации 20 мМ в течение 6 ч индуцировала увеличение внутриклеточного уровня АФК более чем в 2 раза в клетках HeLa G63 (В) и практически не влияла на таковой в клетках ECV 304 (Г). Очевидно, что повышенный базальный уровень АФК, увеличенный ещё и обработкой DCA, способствовал индукции апоптотической гибели клеток HeLa G63. Взаимосвязь между апоптотической гибелью клеток и увеличением внутриклеточного уровня АФК, зарегистрированная нами при обработке DCA клеток HeLa G63, согласуется с результатами исследований [2, 10, 23], выполненных на других клеточных линиях, и подтверждает один из возможных механизмов противоопухолевого действия DCA, а именно — увеличение генерации АФК за счет усиления окислительного фосфорилирования и активации вольтажзависимого K<sup>+</sup>-ионного канала, что приводит к утечке ионов калия и активации каспаз [10]. Селективность действия 2-DG в отношении опухолевых клеток отмечалась

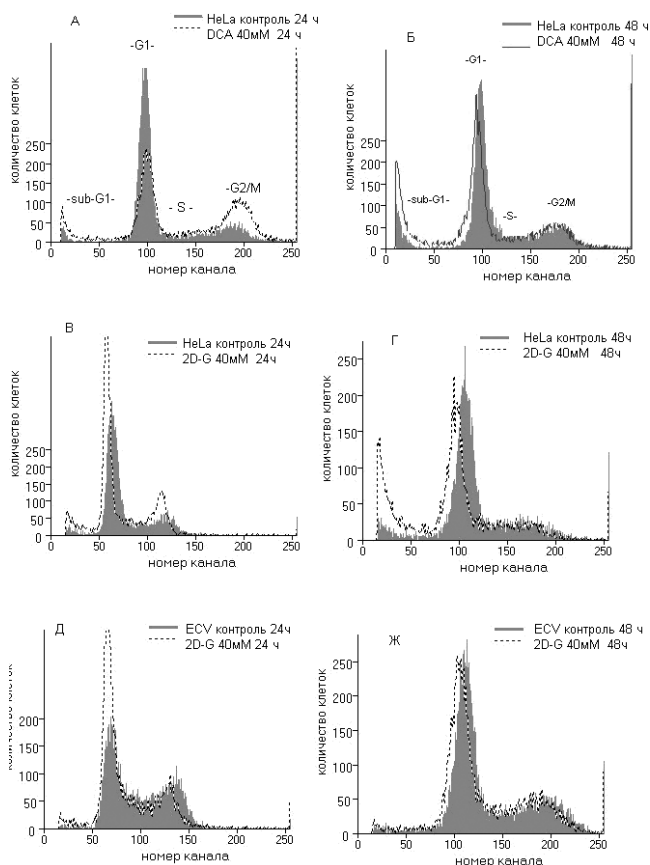


Рис. 1. Гистограммы распределения клеток по содержанию ДНК после 24-часовой инкубации клеток в питательной среде с 40мМ DCA (А) и 2-D-G (В) и 48-часовой инкубации с DCA (Б) и 2-D-G (Г).

рядом авторов [4, 24]. Более того регистрировалась гетерогенная чувствительность различных видов опухолей к токсическому эффекту 2-DG. Предполагается, что это обусловлено рядом факторов: степенью зависимости от глюкозы, гликолиза, источника энергии при снижении уровня АТФ, окислительного стресса и др. [25—27].

Зависимость этих двух клеточных линий от глюкозы оценивали в экспериментах по культивированию клеток в питательной среде с низким содержанием глюкозы (1 г/л). Результаты экспериментов представлены на рис. 3. Из гистограмм видно, что культивирование в среде с низким содержанием глюкозы существенно повышает цитотоксический эффект 2-DG в клетках HeLa G63. При инкубации клеток в нормальной питательной среде (4,5 г/л глюкозы) доля клеток с гиподиплоидным содержанием ДНК в контроле составляла 5% (А), а после добавления в среду 40 мМ 2-DG увеличивалась до 44% (Б). При культивировании клеток с этой же концентрацией 2-DG, но в питательной среде с низким содержанием глюкозы доля клеток с гиподиплоидным содержанием ДНК увеличивалась до 63% (В), что указывает на сильную зависимость этой клеточной линии от уровня глюкозы в питательной среде. Следует отметить, что в клетках линии ECV 304 при культиви-

ровании их как в нормальной среде (Д), так и в среде с низким содержанием глюкозы и с концентрацией 2-DG 40 мМ (5 Е) фракция клеток с гиподиплоидным содержанием ДНК (7%) практически не отличается от контрольной (6%) (Г), что свидетельствует о меньшей зависимости выживаемости этих клеток как от уровня глюкозы, так и от гликолиза. Регистрируемые различия между HeLa G63 и ECV 304 в отношении к уровню глюкозы в питательной среде свидетельствуют о различии метаболических путей получения энергии. Для опухолевых клеток HeLa G63 это гликолитический путь, для ECV 304 — окислительное фосфорилирование, характерное для немалигнизированных клеток [28]. Почти все опухолевые клетки демонстрируют усиленное включение и утилизацию глюкозы. Эта особенность опухолевых клеток сейчас широко используется в медицинской практике для регистрации метастазирующих опухолей с помощью позитрон-эмиссионного сканирования включения 2-(<sup>18</sup>F)-2-дезоксид-Д-глюкозы. При этом остается открытым вопрос, когда и почему опухолевая клетка переходит на этот метаболический путь [29].

Известно, что малигнантной трансформации клеток млекопитающих способствуют онкобелки и опухолевые супрессорные белки, воздействием на пролиферацию, регуляцию клеточного цикла. К агентам, индуцирующим мутации в генах, кодирующих эти белки, обычно относят ионизирующее излучение, химические мутагены, вирусы. Кроме того, показано, что гипоксия и/или стрессовые условия, голодание (например, отсутствие глюкозы) могут инициировать и ускорять процесс малигнантной трансформации. Усиленный гликолиз требуется для того, чтобы адаптироваться к гипоксическим условиям, когда рост опухоли опережает ее васкуляризацию. В ответ на снижение уровня кислорода в тканях увеличивается экспрессия индуцибельного гипоксией транскрипционного фактора альфа 1 (HIF-1 $\alpha$ ). HIF-1 $\alpha$  может прямо регулировать экспрессию генов, вовлеченных как в локальные, так и глобальные реакции на гипоксию, включая большинство гликолитических ферментов [30, 31]. Гипоксия вызывает прогрессирующую продукцию кислородных радикалов и хронически высокий уровень АФК, который со временем стабилизируется в клетках через увеличение экспрессии HIF-2 $\alpha$ , что дает возможность клеткам выживать. Можно предположить, что повышенный внутриклеточный уровень АФК в клетках HeLa G63 обусловлен этими факторами.

Таким образом, нами показано, что ингибирование различных стадий гликолиза приводит к нарушению пролиферации и гибели опухолевых клеток. Селективность действия DCA в отношении опухолевых

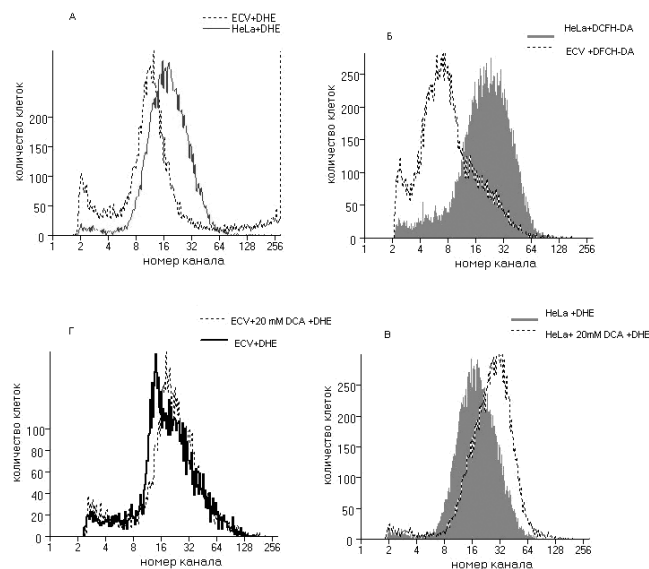


Рис. 2. Внутриклеточный уровень кислородных радикалов в эндотелиоцитах (ECV 304) и в клетках карциномы (HeLa G63) человека: А — базальный уровень АФК в ECV 304 и в клетках HeLa G63, оцененный с помощью DHE; Б — базальный уровень АФК в клетках ECV 304 HeLa G63, оцененный с помощью DCFH-DA; В — внутриклеточный уровень АФК после обработки клеток HeLa G63 20 мМ DCA; Г — внутриклеточный уровень АФК после обработки клеток ECV 304 20 мМ DCA

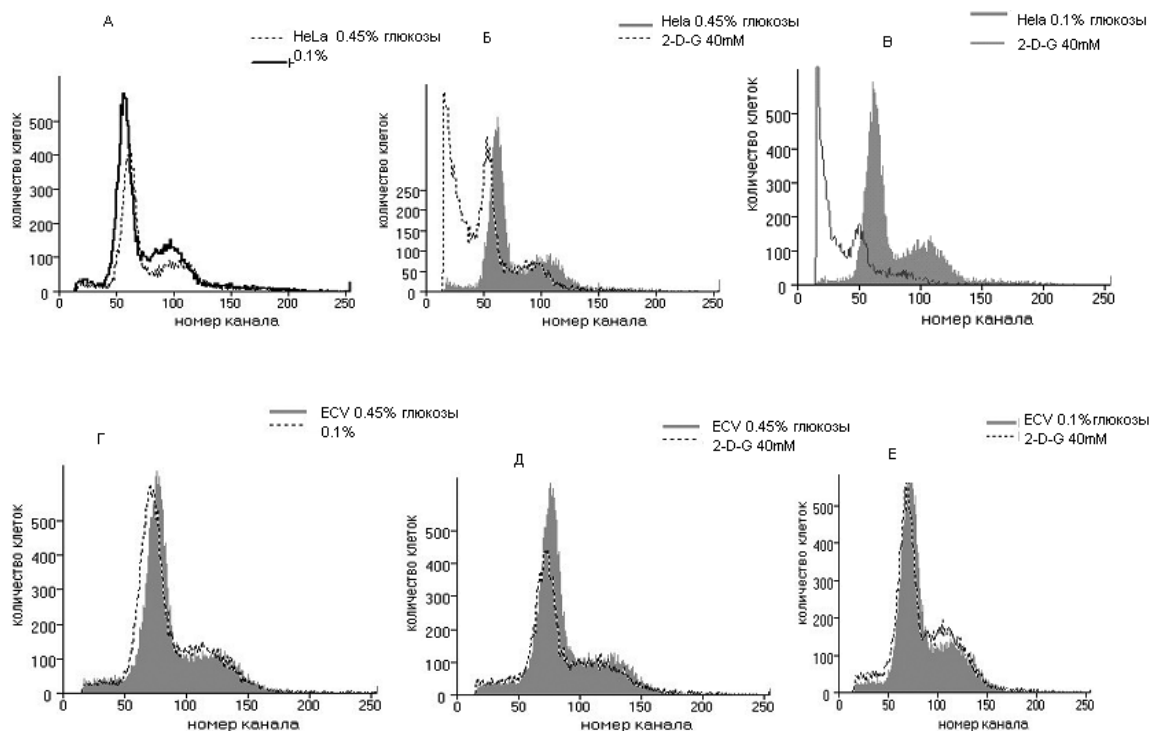


Рис. 3. Сочетанный цитотоксический эффект 2-DG (40 мМ) и питательной среды с низким содержанием глюкозы (1 г/л) на клетки карциномы (HeLa G63) (верхняя панель) и эндотелиоцитов (ECV 304) человека (нижняя панель).

клеток линии HeLa G63 обусловлена увеличением внутриклеточного уровня АФК, который в этих клетках исходно выше, чем в линии ECV 304. Селективность действия 2-DG в отношении опухолевых клеток линии HeLa G63 обусловлена большей зависимостью этой линии от уровня глюкозы, что подтверждается усилением ее цитотоксичности при снижении уровня глюкозы в питательной среде.

Авторы выражают благодарность Г.И. Красоцкой, Ф.М. Ибатуллину и С.И. Степанову за чрезвычайно полезное содействие в проведении исследований.

### Список литературы

1. Warburg O, Posener K, Negelein E. Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Biochem Z.* 1924; 152: 309-44.
2. Warburg O. *The metabolism of tumors.* London: Constable and Co; 1930.
3. Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells. *Mol Aspects Med.* 2010; 31 (1): 60-74.
4. Kurtoglu M, Maher JC, Lampidis TJ. Differential toxic mechanisms of 2-deoxy-D-glucose versus 2-fluorodeoxy-D-glucose in hypoxic and normoxic tumor cells. *Antioxid Redox Signal.* 2007; 9 (9): 1383-90.

5. Maher JC, Krishan A, Lampidis TJ. Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-D-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004; 53: 116-22.

6. Dwarakanath B.S., Zolzer F, Chandna S, et al. Heterogeneity in 2-deoxy-D-glucose induced modifications in energetic and radiation responses of human tumor cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001; 51: 1151-61.

7. Hockenbery D.M., Oltvai Z.N., Yin X.M., et al. Bcl2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell.* 1993; 75: 241-51.

8. Stacpoole P.W. The pharmacology of dichloroacetate. *Metabolism.* 1989; 38 (11):1124-4.

9. Dromparis P., Sutendra G., Michelakis E.D. Metabolic modulation as a novel cancer treatment. *Heart Metab.* 2011; 51: 20-6.

10. Bonnet S., Archer S.L., Allalunis-Turner J, et al. A mitochondria-K<sup>+</sup> channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell.* 2007; 11 (1): 37-51.

11. Wong J.Y., Huggins G.S., Debidda M, et al. Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells. *Gynecol Oncol.* 2008; 109: 394-402.

12. Cao W., Yacoub S., Shiverick K.T., et al. Dichloroacetate (DCA) sensitizes both wild-type and over expressing Bcl-2 prostate cancer cells in vitro to radiation. *Prostate.* 2008; 68: 1223-31.

13. Stockwin L.H., Yu S.X., Borgel S., et al. Sodium Dichloroacetate (DCA) selectively targets cells with defects in the mitochondrial ETC. *Int J Cancer.* 2010; 127 (11): 2510-9

14. Sun W., Zhou S., Chang S.S., et al. Mitochondrial mutations contribute to HIF1alpha accumulation via increased reactive oxygen species and up-regulated pyruvate de-

hydrogenase kinase 2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009; 15: 476-84.

15. Michelakis E.D., Webster L., Mackey J.R. Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *Br J Cancer.* 2008; 99 (7): 989-94.

16. Stepanov S.I., Konyshov V.N., Kotlovanova L.V. Karyotyping of individual cells with flow cytometry. *Cytometry.* 1996; 23: 279-83.

17. Dean P.N., Cray J.W., Dolbear F.A. The analysis and interpretation of DNA distributions measured by flow cytometry. *Cytometry.* 1982; 3: 188-95.

18. Watson J.V. *Flow Cytometry Data Analysis: Basic Concepts and Statistics.* Cambridge: CUP; 2005.

19. Madhok B.M., Yeluri S., Perry S.L., et al. Dichloroacetate induces apoptosis and cell-cycle arrest in colorectal cancer cells. *British Journal of Cancer.* 2010; 102: 1746-52.

20. Гильяно Н.Я., Конева Л.В., Носкин Л.А. Модификация внутриклеточного уровня свободных радикалов и апоптоз в эндотелиоцитах и клетках карциномы человека в культуре. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2010; 150 (11): 577-81.

21. Гильяно Н.Я., Степанов С.И., Конева Л.В., Носкин Л.А. Внутриклеточный уровень NO и его модифицирующая ингибиторами и индукторами NO-синтаза в клетках карциномы и эндотелиоцитах человека. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2007; 143 (2): 211-3.

22. Гильяно Н.Я., Семенова Е.Г., Федорцева Р.Ф., Конева Л.В. Характеристика спонтанно трансформированной эндотелиальной клеточной линии человека ECV304. II. Функциональные особенности клеток. *Цитология.* 2008; 50 (7): 576-85.

23. Michelakis E.D., Sutendra G., Dromparis P., et al. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci Transl Med.* 2010; 2: 31-4.

24. Dwarakanath B.S. Cytotoxicity, radiosensitization, and chemosensitization of tumor cells by 2-deoxy-D-glucose in vitro. *J Cancer Res Ther.* 2009; 5 (1): 27-31.

25. Aft R.L., Zhang F.W., Gius D. Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: Mechanism of cell death. *Br J Cancer.* 2002; 87: 805-12.

26. Ahmad I.M., Abdalla M.Y., Aykin-Burns N, et al. 2-Deoxyglucose combined with wild-type p53 over-expression enhances cytotoxicity in human prostate cancer cells via oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44: 826-34.

27. Coleman M.C., Asbury C.R., Daniels D, et al. 2-Deoxy-D-glucose causes cytotoxicity, oxidative stress, and radiosensitization in pancreatic cancer. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44: 322-31.

28. Ярцева Н.М., Федорцева Р.Ф. Характеристика спонтанно трансформированной эндотелиальной клеточной линии человека ECV304. Множественные хромосомные перестройки. *Цитология.* 2008; 50 (7): 568-76.

29. Upadhyay M., Samal J., Kandpal M. et al. The Warburg effect: insights from the past decade. *Pharmacol Ther.* 2013; 137 (3): 318-30.

30. Kondoh H. Cellular life span and the Warburg effect. *Experimental cell research.* 2008; 314: 1923-8.

31. Кирова Ю.И. Влияние гипоксии на динамику содержания HIF-1 $\alpha$  в коре головного мозга и формирование адаптации у крыс с различной резистентностью к гипоксии. *Патол. физиол. и эксперим. терапия.* 2012; 3: 51-5.

## References

1. Warburg O, Posener K, Negelein E. Uber den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Biochem Z.* 1924; 152: 309-44.

2. Warburg O. *The metabolism of tumors.* London: Constable and Co; 1930.

3. Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells. *Mol Aspects Med.* 2010; 31 (1): 60-74.

4. Kurtoglu M, Maher J.C., Lampidis T.J. Differential toxic mechanisms of 2-deoxy-D-glucose versus 2-fluorodeoxy-D-glucose in hypoxic and normoxic tumor cells. *Antioxid Redox Signal.* 2007; 9 (9): 1383-90.

5. Maher J.C., Krishan A, Lampidis T.J. Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-D-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004; 53: 116-22.

6. Dwarakanath B.S., Zolzer F, Chandna S, et al. Heterogeneity in 2-deoxy-D-glucose induced modifications in energetic and radiation responses of human tumor cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001; 51: 1151-61.

7. Hockenbery D.M., Oltvai Z.N., Yin X.M. et al. Bcl2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell.* 1993; 75: 241-51.

8. Stacpoole P.W. The pharmacology of dichloroacetate. *Metabolism.* 1989; 38 (11):1124-4.

9. Dromparis P., Sutendra G., Michelakis E.D. Metabolic modulation as a novel cancer treatment. *Heart Metab.* 2011; 51: 20-6.

10. Bonnet S., Archer S.L., Allalunis-Turner J. et al. A mitochondria-K<sup>+</sup> channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell.* 2007; 11 (1): 37-51.

11. Wong J.Y., Huggins G.S., Debidda M. et al. Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells. *Gynecol Oncol.* 2008; 109: 394-402.

12. Cao W., Yacoub S., Shiverick K.T., et al. Dichloroacetate (DCA) sensitizes both wild-type and over expressing Bcl-2 prostate cancer cells in vitro to radiation. *Prostate.* 2008; 68: 1223-31.

13. Stockwin L.H., Yu S.X., Borgel S., et al. Sodium Dichloroacetate (DCA) selectively targets cells with defects in the mitochondrial ETC. *Int J Cancer.* 2010; 127 (11): 2510-9.

14. Sun W., Zhou S., Chang S.S., et al. Mitochondrial mutations contribute to HIF1 $\alpha$  accumulation via increased reactive oxygen species and up-regulated pyruvate dehydrogenase kinase 2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009; 15: 476-84.

15. Michelakis E.D., Webster L., Mackey J.R. Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *Br J Cancer.* 2008; 99 (7): 989-94.

16. Stepanov S.I., Konyshov V.N., Kotlovanova L.V. Karyotyping of individual cells with flow cytometry. *Cytometry.* 1996; 23: 279-83.

17. Dean P.N., Cray J.W., Dolbear F.A. The analysis and interpretation of DNA distributions measured by flow cytometry. *Cytometry.* 1982; 3: 188-95.

18. Watson J.V. *Flow Cytometry Data Analysis: Basic Concepts and Statistics.* Cambridge: CUP; 2005.

19. Madhok B.M., Yeluri S., Perry S.L. et al. Dichloroacetate induces apoptosis and cell-cycle arrest in colorectal cancer cells. *British Journal of Cancer.* 2010; 102: 1746-52.

20. Gil'jano N.Ja., Koneva L.V., Noskin L.A. Modification of the level of intracellular free radicals and apoptosis in endothelial cells and human carcinoma cells in culture.

*Bjulleten' jeksperimen-tal'noj biologii i mediciny.* 2010;150 (11): 577-81. (in Russian)

21. Gil'jano N.Ja., Stepanov S.I., Konevega L.V., Noskin L.A. Intracellular levels of NO and its inhibitor-modifiability and inducers of NO-synthase in endothelial cells and human carcinoma. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny.* 2007; 143 (2): 211-3. (in Russian)

22. Gil'jano N.Ja., Semenova E.G., Fedorceva R.F., Konevega L.V. Characteristics of spontaneously transformed human endothelial cell line ECV304. II. Functional characteristics of cells. *Citologija.* 2008; 50 (7): 576-85. (in Russian)

23. Michelakis E.D., Sutendra G, Dromparis P, et al. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci Transl Med.* 2010; 2: 31-4.

24. Dwarakanath B.S. Cytotoxicity, radiosensitization, and chemosensitization of tumor cells by 2-deoxy-D-glucose in vitro. *J Cancer Res Ther.* 2009; 5 (1): 27-31.

25. Aft R.L., Zhang F.W., Gius D. Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: Mechanism of cell death. *Br J Cancer.* 2002; 87: 805-12.

26. Ahmad I.M., Abdalla M.Y., Aykin-Burns N. et al. 2-Deoxyglucose combined with wild-type p53 over-expressi-

on enhances cytotoxicity in human prostate cancer cells via oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44: 826-34.

27. Coleman M.C., Asbury C.R., Daniels D, et al. 2-Deoxy-D-glucose causes cytotoxicity, oxidative stress, and radiosensitization in pancreatic cancer. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44: 322-31.

28. Jarceva N.M., Fedorceva R.F. Characteristics of spontaneously transformed human endothelial cell line ECV304. Multiple chromosomal aberrations. *Citologija.* 2008; 50 (7): 568-76. (in Russian)

29. Upadhyay M., Samal J., Kandpal M. et al. The Warburg effect: insights from the past decade. *Pharmacol Ther.* 2013; 137 (3): 318-30.

30. Kondoh H. Cellular life span and the Warburg effect. *Experimental cell research.* 2008; 314: 1923-8.

31. Kirova Ju.I. Effect of hypoxia on the dynamics of the HIF-1 $\alpha$  content in the cerebral cortex and the formation of adaptation in rats with different resistance to hypoxia. *Patol. fiziol. i jeksperim. terapija.* 2012; 3: 51-5. (in Russian)

Поступила 29.10.14

Received 29.10.14

### Сведения об авторах:

Бондарев Геннадий Николаевич — канд. хим. наук, Петербургский институт ядерной физики им. Б.П.Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», ст. науч. сотр., лаб. органической и медицинской химии

Конева Леонид Владимирович — канд.биол. наук, Петербургский институт ядерной физики им. Б.П.Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», ст. науч. сотр. лаб. молекулярной генетики, e-mail: konevega@omrb.pnpi.spb.ru

Носкин Леонид Алексеевич — д. биол. наук, проф., Петербургский институт ядерной физики им. Б.П.Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», зав. лаб. медицинской биофизики, e-mail: noskin@omrb.pnpi.spb.ru

Журишкина Елена Васильевна — инженер, Петербургский институт ядерной физики им. Б.П.Константинова, НИЦ «Курчатовский институт»

Алчинова Ирина Борисовна — канд. биол. наук, ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», лаб. физико-химической и экологической патофизиологии, вед. науч. сотр., e-mail: AlchinovaIrina@yandex.ru

Абакумова Т.В., Антонеева И.И., Генинг Т.П., Генинг С.О., Долгова Д.Р., Фомина А.В.

## **Цитокиновый профиль и метаболическая активность нейтрофилов периферической крови при прогрессировании неоплазмы**

ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», 432017, Ульяновск, ул.Льва Толстого, 42

Нейтрофил на сегодня рассматривается как своеобразная одноклеточная секреторная железа, реализующая эффекторный потенциал, в том числе и путем секреции растворимых продуктов — цитокинов, матричных металлопротеиназ. Влияние опухоли на функциональную активность нейтрофилов зависит от типа, локализации и стадии ее развития. В нашем исследовании изучена динамика метаболической и фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови, содержания в лизате и сыворотке крови цитокинов IL-1 $\beta$ , 1Ra, 2, 6, 10, 18, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и матричных металлопротеиназ-2 и 9 при прогрессировании рака шейки матки. Цитокины и металлопротеиназы определяли иммуноферментным методом, показатели метаболизма — активность миелопероксидазы, щелочной фосфатазы, уровень катионных белков, долю активных клеток в спонтанном НСТ-тесте — цитохимически. Показано, что при прогрессировании рака шейки матки на фоне увеличения общего количества нейтрофилов, имеет место значимое снижение их фагоцитарной активности, аэробной и анаэробной бактерицидности, снижение уровня IL-1 $\beta$  и IL-1 Ra, а также IFN- $\gamma$  при повышении TNF- $\alpha$ , повышение продукции матричной металлопротеиназы-2 на Ib—IIa стадии заболевания, что позволяет предполагать возникновение на этой стадии развития неоплазмы проопухолевого эффекта нейтрофилов.

**Ключевые слова:** нейтрофилы, рак шейки матки, цитокины, матричные металлопротеиназы

Abakumova T.V., Antoneeva I.I., Gening T.P., Gening S.O., Dolgova D.R., Fomina A.V.

## **Cytokines profile and metabolic activity of neutrophils of peripheral blood when progressing neoplasma**

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, 42, Leo Tolstoy St., 432017

The neutrophil is considered as the peculiar monocelled sekretorny gland realizing the effector potential including by secretion of soluble products — cytokines and for today. Influence of a tumor on functional activity of neutrophils depends on type, localization and a stage of its development. In our research dynamics of metabolic and of neutrophils of peripheral blood, the contents in a lysate and serums of blood of cytokines of IL-1 $\beta$ , 1Ra, 2, 6, 10, 18, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and is studied when progressing a cervical cancer. Cytokines and metabolism indicators — activity of , determined by an immunoferrmental method, level of cationic proteins, a share of active cages in the spontaneous NST-test were cytochemical. It is shown that when progressing cervical cancer against increase in total of neutrophils significant decrease in their , aerobic and anaerobic bacterial action, decrease in the IL-1 $\beta$  and IL-1 Ra level, and also IFN- $\gamma$  takes place at TNF- $\alpha$  increase, increase of production of matrix metalloproteinase-2 on Ib—IIa of a stage of a disease that allows to assume emergence at this stage of cervical cancer of pro-tumoral effect of neutrophils.

**Key words:** neutrophils, cervical cancer, cytokines,

Считается установленным, что нейтрофилы периферической крови (Нф) в организме-опухоленосителе могут играть как про-, так и противоопухолевую роль [1, 2]. Данные литературы и результаты наших исследований [3, 4] позволяют предполагать модифицирующее влияние неоплазмы на фенотип Нф.

Цель исследования — оценка цитокинового профиля и метаболической активности нейтрофилов периферической крови при прогрессировании неоплазмы.

### **Методика**

Обследуемая группа состояла из 87 первичных больных раком шейки матки (РШМ) I—IV стадии (по FIGO). Контрольную группу составили практически здоровые женщины. Для приготовления лизата

Для корреспонденции: Генинг Татьяна Петровна, д. биол.наук., проф., акад. РАЕН, зав. каф. физиологии и патофизиологии Ульяновского государственного университета, e-mail: Naum-53@yandex.ru

нейтрофилов клетки выделяли из 5 мл гепаринизированной крови на двойном градиенте плотности фиколл-урографина ( $\rho = 1,117$  и  $1,077$  г/мл). Взвесь нейтрофилов трижды отмывали физиологическим раствором. Чистота фракции нейтрофилов составляет 92—94% [5]. Жизнеспособность нейтрофилов в тесте с 0,5%-ным трипановым синим составляла 95%. Выделенные и отмывые нейтрофилы перемещали по  $50 \pm 5$  тыс. клеток в 0,15 мл физиологического раствора, и путем замораживания/оттаивания из них получали лизаты. Спонтанную продукцию цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-2, IL-6, IL-10, IL-18, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , ЗАО «Вектор-Бест-Волга», Н.Новгород) и активных форм матриксных металлопротеиназ (ММП-2,-9, (Quantikine, R&D Systems, USA), ЗАО «БиоХимМак», Москва) определяли твердофазным иммуоферментным методом в лизате Нф и сыворотке крови. Лизаты Нф и сыворотка крови хранилась в течение месяца при  $-25^\circ\text{C}$ . Для оценки фагоцитарной активности Нф рассчитывали фагоцитарный индекс (ФИ) по Гамбургеру, фагоцитарное число (ФЧ) по Райту и индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ):  $\text{ИЗФ} = \text{ФЧ } 5^\circ / \text{ФЧ } 60^\circ$  [6]. Цитохимически в Нф определяли активность миелопероксидазы (МПО) по методу Грэхема—Кнолля с бензидином [7]; уровень катионных белков (КБ) — по методу М.Г.Шубича с бромфеноловым синим [8], щелочной фосфатазы (ЩФ) методом азосочетания по Rutenburg с соавт. [9], долю активных нейтрофилов (ДАН) в спонтанном варианте с восстановлением нитросинего тетразолия в нерастворимый диформазан [10]. Результаты выражали в виде среднего цитохимического коэффициента (СЦК). В каждой мазке подсчитывали 100 или 50 Нф, среди которых определяли процент клеток, содержащих отложения соответствующего фермента и подсчитывали средний цитохимический коэффициент по формуле [11]:

$$\text{СЦК} = \frac{0 \cdot a + 1 \cdot b + 2 \cdot c + 3 \cdot d}{100},$$

где:

$a$  — количество Нф без гранул;

$b, c, d$  — количество Нф с различной степенью окрашивания цитоплазмы.

Цифры указывают на интенсивность окраски цитоплазмы:

0 — отсутствие окраски;

1 — наличие в цитоплазме единичных гранул;

2 — гранулы занимают до 1/3 площади цитоплазмы;

3 — гранулы занимают больше 1/2 площади цитоплазмы.

В качестве центральной характеристики применяли медиану, а при сравнении использовали непараметрический критерий Манна—Уитни.

## Результаты и обсуждение

В ходе исследований установлено значимое увеличение абсолютного и относительного количества Нф (рис. 1).

ФИ у больных РШМ был значимо снижен по сравнению с контролем и составил на Ia стадии  $40,4 \pm 0,4\%$ ; на Ib—IIa стадии  $30,6 \pm 4,4\%$  и  $35,1 \pm 5,9\%$  на IIb—IV стадии против  $70,8 \pm 0,4\%$  в контроле. Также было снижено ФЧ:  $1,54 \pm 0,08$  у.е. на Ia стадии и  $1,46 \pm 0,08$  у.е. на IIb—IV стадии против  $1,97 \pm 0,18$  у.е. в контроле. При этом фагоцитоз идет, возможно, по незавершенному типу, так как ИЗФ на всех клинических стадиях заболевания меньше 1,0.

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы [1] о зависимости фенотипа Нф от стадии опухолевого процесса. Так, на Ia стадии при незначительном снижении общего количества Нф (рис. 1) резко и значимо снижается их фагоцитарная активность при одновременном нарушении завершенности фагоцитоза, но возрастает ДАН в НСТ-тесте, активность МПО и КФ (рис. 2). При местноразличном процессе (Ib—IIa стадии) абсолютное количество Нф значимо увеличивается, но продолжает снижаться фагоцитарная активность, резко снижена и количества ДАН, не изменяется активность МПО, определяющая аэробную бактерицидность. Остается повышенной активность КФ и значимо снижается уровень КБ — показатель анаэробной бактерицидности. На стадии распространенного процесса (IIb—IV) продолжает увеличиваться абсолютное количество Нф и повышается уровень КБ (рис. 2).

В настоящее время считается доказанной роль Нф в формировании «цитокиновой сети». Они могут секретировать ряд про- и противовоспалительных цитокинов

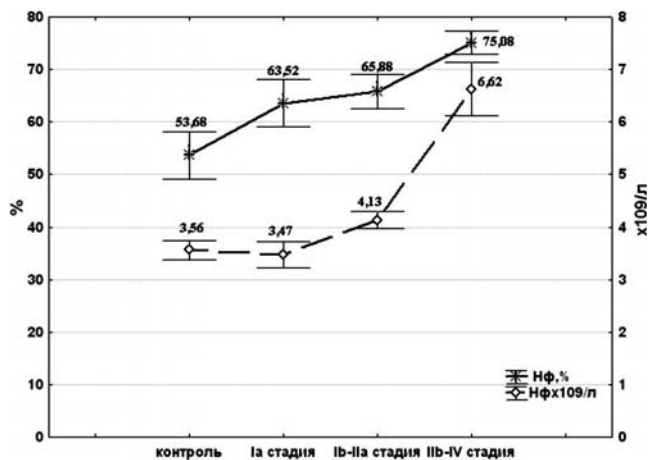


Рис. 1. Абсолютное и относительное количество Нф на различных клинических стадиях РШМ.

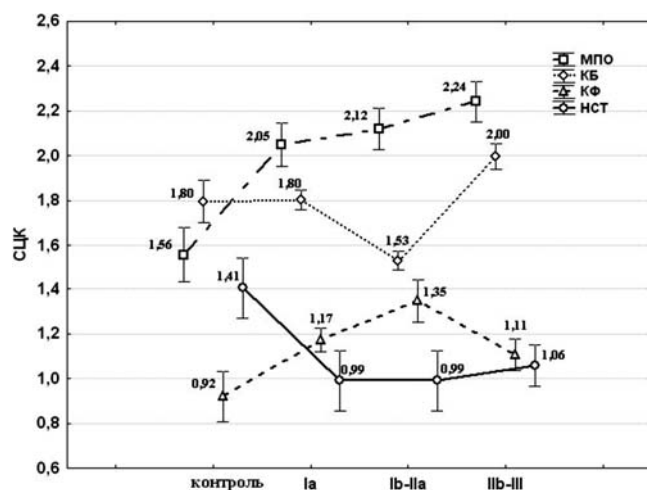


Рис. 2. Показатели метаболической активности периферических Нф при прогрессировании РШМ

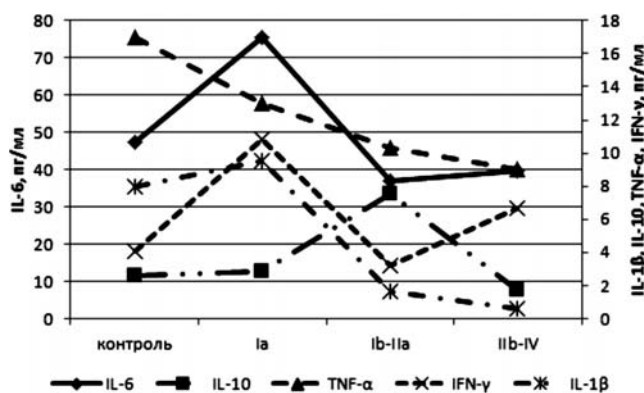


Рис. 3. Уровень цитокинов в сыворотке крови.

[12, 13], отвечать на воздействие цитокинов повышением экспрессии генов, участвующих в реализации фагоцитоза, и рецепторов, присущих антигенпрезентирующим клеткам. В то же время раковые клетки секретируют широкий спектр цитокинов [14]. В экспериментах *in vitro* показано влияние цитокинов, активирующих Нф вследствие воздействия их на сигнальные пути [15]. Су-

ществует мнение, что смена противоопухолевого действия Нф на проопухолевое может быть результатом действия биологически активных веществ, и, в том числе, цитокинов, продуцируемых опухолью [16].

Нами было установлено значимое повышение уровня IL-6 и IFN- $\gamma$ , тенденция к увеличению IL-1 $\beta$  и IL-10 и снижение уровня TNF- $\alpha$  в сыворотке крови на Ia стадии заболевания (рис. 3).

В лизате Нф уровни IL-6, 10 и TNF- $\alpha$  также возрастали, IFN- $\gamma$  был на уровне контроля, и снижались по сравнению с контролем уровни IL-18, IL-1 $\beta$  и IL-1Ra (таблица). Снижение уровня TNF- $\alpha$  коррелирует с падением фагоцитарной активности Нф на стадии Ib—IIa ( $r = 0,3550$ ;  $\rho < 0,02$ ) и на стадии IIb—IV ( $r = 0,5600$ ;  $\rho < 0,02$ ). В то же время ряд экспериментов показывает, что Нф повреждают опухолевые клетки с помощью растворимых медиаторов (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ ). Определяемые нами уровни TNF- $\alpha$  в лизате Нф были значимо повышены на всех стадиях заболевания (таблица), в то время как уровни IL-1 $\beta$  были снижены, а IFN- $\gamma$  — снижены до 0 на стадии Ib—IIa, либо были на уровне нормы на остальных стадиях (таблица).

IL-1 $\beta$ , продуцируемый Нф, все свои эффекты осуществляет через взаимодействие с рецепторами IL-1Ra. Нами установлено пониженное количество IL-1Ra в лизате Нф больных уже на Ia стадии и значимо снижающееся при прогрессировании заболевания (табл.). При оценке корреляции уровня IL-1 $\beta$  в сыворотке крови с ДАН нами установлены слабые коррелятивные связи на Ib—IIa стадии ( $r = 0,3551$ ;  $\rho < 0,02$ ) и IIb—IV стадии ( $r = 0,3590$ ;  $\rho < 0,02$ ).

ММП-9 играет существенную роль в механизмах опухолевой прогрессии [17]. Существует точка зрения, согласно которой, ММП-9 может тормозить прогрессирование опухолевого процесса, в частности, за счет генерирования ангиогенного ингибитора ангиостатина, тормозящего ангиогенез, рост первичной опухоли и метастазирование [18]. Наблюдаемое нами снижение уровня ММП-9 (рис.4) при РШМ в сыворотке крови и лизате Нф, служащих одним из клеточных источников

Таблица

Уровень цитокинов (пг/мл) в лизате Нф при прогрессировании РШМ

|                           | IL-1 $\beta$            | IL-1Ra                    | IL-2                     | IL-6                  | IL-10                    | IL-18                    | TNF- $\alpha$       | IFN- $\gamma$        |
|---------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------|----------------------|
| Доноры, n = 30            | 12,908<br>(0-42,268)    | 3000<br>(3000-3000)       | 81,329<br>(32,46-127,41) | 1,504<br>(0,65-3,521) | 68,163<br>(0-139,82)     | 39,79<br>(5,378-160,66)  | 1,5835<br>(0-5,674) | 1,007<br>(1,66-3,56) |
| РШМ Ia стадия, n = 24     | 8,074*<br>(0-15,19)     | 2831,42<br>(2325,69-3000) | 68,49*<br>(0-97,46)      | 2,276*<br>(1,33-3,41) | 96,93*<br>(15,04-141,95) | 24,29*<br>(2,1-137,49)   | 3,435*<br>(0-7,9)   | 0,97<br>(0-6,47)     |
| РШМ Ib—IIa стадия, n = 24 | 3,739*<br>(0-8,102)     | 2404,23<br>(918,225-3000) | 49,16*<br>(8,763-91,878) | 0,555*<br>(0-1,144)   | 88,37*<br>(5,44-145,50)  | 72,26*<br>(6,885-193,66) | 4,68*<br>(0-14,39)  | 0                    |
| РШМ IIb—IV стадия, n = 24 | 4,66*<br>(0,415-10,631) | 1702,3*<br>(808,864-3000) | 65,78*<br>(58,25-73,306) | 0,872<br>(0-1,575)    | 93,71*<br>(0-191,15)     | 93,74*<br>(6,159-369,99) | 7,75*<br>(0-21,3)   | 0,979<br>(0-6,76)    |

Примечание. \* — данные статистически значимо отличаются от аналогичных в контрольной группе



ММП-9 [19], позволяет предполагать неэффективность ММП-9 в качестве мишени для противоопухолевой терапии при РШМ. ММП-2 в кровотоке, помимо Нф, может секретироваться циркулирующими опухолевыми клетками и тромбоцитами [20] и, по данным литературы, включена в механизмы опухолевой инвазии [21] и опухолиндуцированного ангиогенеза [22].

Нами установлено существенное и значимое повышение уровня ММП-2 в сыворотке крови при неизменном её уровне в лизате Нф на всех стадиях РШМ (рис. 4).

### Заключение

Таким образом, полученные данные позволяют предполагать у больных при прогрессировании РШМ на фоне увеличения общего количества Нф значимое снижение их фагоцитарной активности, аэробной и анаэробной бактерицидности на Ib—IIa стадии заболевания. На этой же стадии в Нф снижен уровень IL-1 $\beta$  и его рецептора IL-1Ra, а также количество IFN- $\gamma$ . При этом возрастает уровень провоспалительного цитокина TNF- $\alpha$ . На Ib—IIa стадии РШМ имеет место нарастание уровня TNF- $\alpha$  и IL-18, при одновременном снижении уровня IFN- $\gamma$ , IL-1Ra и IL-2, благоприятный для прогрессирования неоплазмы. Динамика ММП-2 и -9 в сыворотке и лизате Нф не коррелирует со стадией РШМ. Наблюдаемые изменения функционального состояния Нф и цитокинового статуса сыворотки крови позволяют предполагать возможность возникновения проопухолевого эффекта Нф на Ib—IIa стадии РШМ.

*Работа выполнена при поддержке базовой части гос. задания Минобрнауки России*

### Список литературы

1. Mueller M.M., Fusenig N.E. Friends or foes — bipolar effects of the tumour stroma in cancer. 2004; 4(11): 839-49.
2. Клишо Е.В. Матриксные металлопротеиназы и их тканевые ингибиторы при плоскоклеточном раке головы и шеи: Автореферат дис. д-ра мед. наук. Томск; 2011. 43 с.
3. Klink M., Jastrzebska K., Nowak M. et al. *Scand J Immunol.* 2008; 68(3): 328-36.
4. Антонеева И.И., Генинг Т.П. Нейтрофильные гранулоциты в динамике прогрессии рака яичников. *Клин.лаб.диагностика.* 2007; 8: 43-6.
5. Алборов Р.Г. Роль клеток крови в связи между толерантностью к тромбину, содержанием в кровотоке продуктов взаимодействия тромбин-фибриноген и липидпероксидацией: Автореферат дис. д-ра мед. наук. Тюмень; 2006. 45 с.
6. Коган А.Х. Фагоцитзависимые кислородные — свободнорадикальные механизмы аутоагрессии в патогенезе внутренних болезней. . 1999; 2: (3).

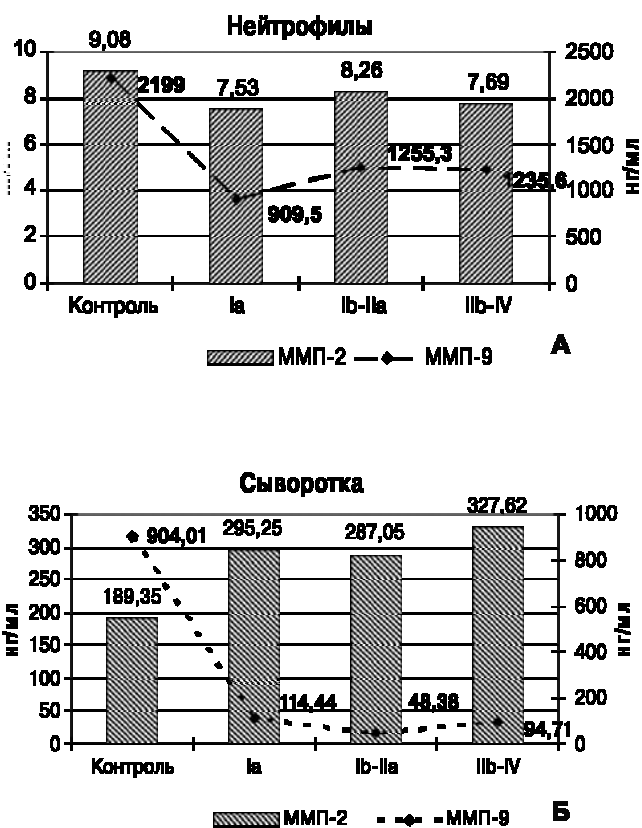


Рис. 4. Изменение уровня матриксных металлопротеиназ в лизате нейтрофилов (А) и сыворотке крови (Б).

7. Долгушин И.И., Бухарин О.В. Нейтрофилы и гомеостаз. Екатеринбург; 2001. 278с.

8. Шубич М.Г. Выявление катионного белка в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего. *Цитология.* 1974; 16(10): 1321-2.

9. Шубич М.Г., Нагоев Б.С. Щелочная фосфатаза лейкоцитов в норме и патологии. М.: Медицина; 1980. 224с.

10. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Система интерлекинов и рак. Киев; 2000. 224с.

11. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии (справочник). СПб.: «Интермедика»; 1999; 656с.

12. Нестерова И.В., Швыдченко И.Н., Роменская В.А. Нейтрофильные гранулоциты — ключевые клетки иммунной системы. *Аллергология и иммунология.* 2008; 9(4): 432-6.

13. Cassatella M.A., Mosna F., Micheletti A. et al. Toll-like receptor-3-activated human mesenchymal stromal cells significantly prolong the survival and function of neutrophils. *Stem Cells.* 2011; 29(6): 1001-11.

14. Gregory A.D., Houghton A.M. Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res.* 2011; 71(7): 2411-6.

15. Iking-Konert C., Cseko C., Wagner C. et al. Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils: acquisition of CD83 and other functional characteristics of dendritic cells. *J Mol Med (Berl).* 2001; 79(8): 464-74.

16. Мальцева В.Н., Сафронова В.Г. Неоднозначность роли нейтрофилов в генезе опухоли. *Цитология*. 2009; 6: 467-74.

17. Ганусевич И.И. Роль матриксных металлопротеиназ (ММП) при злокачественных новообразованиях. II. Участие ММП в ангиогенезе, инвазии и метастазировании опухолей. *Онкология*. 2010; 12(2): 108-17.

18. Chen X., Su Y., Fingleton B. et al. Increased plasma MMP9 in integrin alpha1-null mice enhances lung metastasis of colon carcinoma cells. *Int J Cancer*. 2005; 116(1): 52-61.

19. Acuff H.B., Carter K.J., Fingleton B. et al. Matrix metalloproteinase-9 from bone marrow-derived cells contributes to survival but not growth of tumor cells in the lung microenvironment. *Cancer Res*. 2006; 66(1): 259-66.

20. Dashevsky O, Varon D, Brill A. Platelet-derived microparticles promote invasiveness of prostate cancer cells via upregulation of MMP-2 production. *Int J Cancer*. 2009; 124(8): 1773-7.

21. Zhu X., Mulcahy L.A., Mohammed R.A. et al. IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res*. 2008; 10(6): 95.

22. Chetty C., Lakka S.S., Bhoopathi P. et al. *Cancer Res*. 2008; 68(12): 4736-45.

## References

1. Mueller M.M., Fusenig N.E. Friends or foes — bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(11): 839-49.

2. Klisho E.V. Matrix metalproteinase and their fabric inhibitors at a low-grade squamous intraepithelial lesion cancer of the head and a neck: Diss. Tomsk; 2011; 43 p. (in Russian)

3. Klink M., Jastrzebska K., Nowak M. et al. Ovarian cancer cells modulate human blood neutrophils response to activation in vitro. *Scand J Immunol*. 2008; 68(3): 328-36.

4. Antoneeva I.I., Gening T.P. Neutrophilic granulocytes in the time progression of ovarian cancer. *Klin. Lab. Diagnostika*. 2007; 8: 43-6. (in Russian)

5. Alborov R.G. Role of blood cells in communication between tolerance to thrombin, the contents in a blood-groove of products of interaction thrombin-fibrinogen and a lipidperoxidation: Diss. Tyumen; 2006; 45 p. (in Russian)

6. Kogan A.H. Phagocyte's depend the oxygen — free radical mechanisms of an autoaggression in патогенезе internal diseases. *The Messenger of the Russian academy of medical sciences*. 1999; 2: 3. (in Russian)

7. Dolgushin I.I., Bukharin O.V. Neutrophils and homeostasis. Ekaterinburg; 2001; 278 p. (in Russian)

8. Shubich M.G. Identification of cationic protein in cytoplasm of leukocytes by means of bromfenolovy blue. *Cytology*. 1974; 16(10): 1321-2. (in Russian)

9. Shubich M.G., Nagoev B.S. Alkaline phosphatase of leukocytes in norm and pathology. M.: Medicine; 1980; 224p. (in Russian)

10. Berezhnaya N.M., Chekhun V.F. Sistema of interleukin and cancer. Kiev; 2000. 224p. (in Ukraine)

11. Karpishchenko A.I. Medical laboratory technologies (reference book). SPb.: «Intermedika»; 1999; 656p. (in Russian)

12. Nesterova I.V., Shvydchenko I.N., Romensky V.A. Neutrophils granulocytes — key cages of immune system. *Allergology and immunology*. 2008; 9(4): 432-6. (in Russian)

13. Cassatella M.A., Mosna F., Micheletti A., et al. Toll-like receptor-3-activated human mesenchymal stromal cells significantly prolong the survival and function of neutrophils. *Stem Cells*. 2011; 29(6): 1001-11.

14. Gregory A.D., Houghton A.M. Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res*. 2011; 71(7): 2411-2416.

15. Iking-Konert C., Cseko C., Wagner C. et al. Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils: acquisition of CD83 and other functional characteristics of dendritic cells. *J Mol Med (Berl)*. 2001; 79(8): 464-74.

16. Maltseva V.N., Safronov V.G. Ambiguity role of neutrophils in oncogenesis *Cytology*. 2009; 6:467-74. (in Russian)

17. Ganusevich I.I. Role the matriksi metalproteinases (MMP) at malignant new growths. II. MMP participation in angiogenesis, invasions and metastazirovaniya of tumors. *Oncology*. 2010;12(2): 108-17. (in Russian)

18. Chen X., Su Y., Fingleton B. et al. *Int J Cancer*. 2005; 116(1): 52-61.

19. Acuff H.B., Carter K.J., Fingleton B. et al. Matrix metalloproteinase-9 from bone marrow-derived cells contributes to survival but not growth of tumor cells in the lung microenvironment. *Cancer Res*. 2006; 66(1): 259-66.

20. Dashevsky O, Varon D, Brill A. Platelet-derived microparticles promote invasiveness of prostate cancer cells via upregulation of MMP-2 production. *Int J Cancer*. 2009; 124(8): 1773-7.

21. Zhu X., Mulcahy L.A., Mohammed R.A. et al. IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res*. 2008; 10(6): 95.

22. Chetty C., Lakka S.S., Bhoopathi P. et al. *Cancer Res*. 2008; 68(12): 4736-45.

Поступила 11.11.14

Received 11.11.14

## Сведения об авторах:

Абакумова Татьяна Владимировна — канд. биол. наук, доцент каф. физиологии и патофизиологии Ульяновского государственного университета, e-mail: taty-abakumova@yandex.ru

Антонеева Инна Ивановна — доктор мед. наук, проф. каф. онкологии и лучевой диагностики Ульяновского государственного университета, e-mail: aii72@mail.ru

Генинг Снежанна Олеговна — клинический ординатор по специальности «Онкология» Ульяновского государственного университета, e-mail: Naum-53@yandex.ru

Долгова Динара Ришатовна — канд. биол. наук, доцент каф. физиологии и патофизиологии Ульяновского государственного университета, e-mail: dolgova.dinara@yandex.ru

Фомина Анастасия Владимировна — канд. биол. наук, инженер-исследователь Научно-исследовательского медико-биологического центра Ульяновского государственного университета, e-mail: saylorxmoon@mail.ru

Ремизова М.И., Гербут К.А., Гришина Г.В., Нагорная К.Н.

## **Действие доноров оксида азота на микроциркуляцию при инфузионной терапии геморрагического шока в эксперименте**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», 191024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16

*На модели геморрагического шока у крыс показано благоприятное действие на системную гемодинамику, микроциркуляцию, кислотно-основное состояние крови доноров оксида азота (L-аргинина и оксакома), вводимых как до кровопотери, так и после развития геморрагического шока. Применение доноров оксида азота существенно повышало выживаемость животных. L-аргинин и оксаком могут найти применение как в предоперационном периоде, так и при лечении геморрагического шока в составе инфузионных сред.*

**Ключевые слова:** *геморрагический шок, инфузионная терапия, кровообращение, оксид азота, L-аргинин, оксаком*

Remizova M.I., Gerbout K.A., Grishina G.V., Nagornaya K.N.

## **Influence of the nitric oxide donors on the microcirculation in infusion therapy of the experimental hemorrhagic shock**

Federal State Budget Institution «Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology Federal Medico-Biological Agency», St-Petersburg, Russia

*Infusion of the nitric oxide donors L-Arginine (150 mg/kg bolus) and Oxacom (3,2 μM/ kg bolus) with saline solution has been shown improves cardiovascular and metabolic changes in animal model of hemorrhagic shock. As a result improves survival rats. These data made this effect clinically attractive.*

**Key words:** *hemorrhagic shock, infusion therapy, rats, blood circulation, nitric oxide, L-Arginine, Oxacom*

Инфузионная терапия, восполняя утраченный объем крови при геморрагическом шоке, не всегда стойко восстанавливает ток крови в магистральных сосудах и в сосудах микроциркуляторного русла, что делает необходимым введение в организм терапевтических средств, способных поддерживать кровоток и, особенно, транскапиллярный обмен в микрососудах. Одним из путей восстановления микрокровотока является воздействие на эндотелиальный фактор расслабления сосудов, отождествляемый с оксидом азота (NO) [1].

Для обеспечения микроциркуляции и транскапиллярного обмена организму необходимо постоянно поддерживать так называемый базальный уровень NO. Одновременное дезагрегирующее действие NO и уменьшение адгезии тромбоцитов к стенкам сосудов способствует нормальному метаболизму в тканях и органах. Субстратом для образования NO является L-аргинин, а продукция базального уровня регулируется

эндотелиальной конститутивной синтазой (eNOS). Влиять на кровоток в сосудах возможно, направленно воздействуя на синтез оксида азота. Базальный уровень NO может быть поддержан как введением L-аргинина, так и препаратами, обратимо связывающими молекулы эндогенного NO, обеспечивая этим их сохранность при экстремальных состояниях и перемещение NO в клетки жизненно важных органов. Одним из таких препаратов является оксаком (динитрозильный комплекс железа с глутатионом), созданный под руководством профессора А.Ф.Ванина в НИИ химической физики РАН (Москва).

*Цель исследования* — изучение влияния доноров оксида азота L-аргинина и оксакома на кровоток в капиллярах серозной оболочки тонкой кишки крыс при инфузионной терапии геморрагического шока.

### **Методика**

Выполнено 5 серий экспериментов на крысах самках массой  $230 \pm 5$  г, под тиопенталовым наркозом (35—40 мг/кг). Кровопотерю (2,6—2,8 мл/100 г) проводили дробными кровопусканиями из левой сон-

**Для корреспонденции:** Ремизова Марина Иосифовна, д.мед.наук, гл. науч. сотр., руководитель группы экспериментальной трансфузиологии отдела кровезаменителей и компонентов крови ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России.

ной артерии в течение 35—45 мин до снижения артериального давления (АД) до 65—48 мм рт.ст.

1-я серия (n = 19) — контрольная, в которой по окончании кровопотери крысам вводили изотонический раствор натрия хлорида (ФР) в объеме, превышавшем в 2 раза объем эксфузированной крови.

Во 2-й серии (n = 10) за 20 мин до кровопотери вводили L-аргинин («Мерк») в дозе 150 мг/кг, а после кровопотери — ФР в том же объеме, что и в контроле.

В 3-й серии (n = 7) L-аргинин (150 мг/кг) вводили в составе ФР по окончании кровопотери.

В 4-й (n = 9) и 5-й (n = 8) сериях вводили оксаком (3,2 мкМ/кг) по той же схеме, как L-аргинин во 2-й и 3-й сериях опытов.

Определяли АД, ударный объем сердца (УО) методом тетраполярной реографии [2]. Рассчитывали минутный объем кровообращения (МОК), общее периферическое сопротивление сосудов (ОПС) и рабочий индекс левого желудочка (РИЛЖ). О состоянии микроциркуляции (МЦ) судили визуально по характеру микрокровотока в сосудах серозной оболочки тонкого кишечника методом контактной микроскопии в отраженном свете (микроскоп ЛЮАМ-КФ, ЛОМО). Изменения кровотока оценивали по балльной шкале [3]. Отсутствие видимых нарушений в капиллярах регистрировали как «0» баллов. С замедлением скорости движения эритроцитов по сосудам и появлением в микрососудах агрегатов клеточных элементов крови величина балла возрастала. Остановка кровотока в микрососудах оценивалась как стаз, величина балла при этом была максимальной и равнялась четырем. Микрокровоток исследовали до кровопотери, в состоянии геморрагического шока и через 10 и 60 минут после окончания инфузии кровезаменителя. В эти же периоды эксперимента производили

риферическое сопротивление сосудов (ОПС) и рабочий индекс левого желудочка (РИЛЖ). О состоянии микроциркуляции (МЦ) судили визуально по характеру микрокровотока в сосудах серозной оболочки тонкого кишечника методом контактной микроскопии в отраженном свете (микроскоп ЛЮАМ-КФ, ЛОМО). Изменения кровотока оценивали по балльной шкале [3]. Отсутствие видимых нарушений в капиллярах регистрировали как «0» баллов. С замедлением скорости движения эритроцитов по сосудам и появлением в микрососудах агрегатов клеточных элементов крови величина балла возрастала. Остановка кровотока в микрососудах оценивалась как стаз, величина балла при этом была максимальной и равнялась четырем. Микрокровоток исследовали до кровопотери, в состоянии геморрагического шока и через 10 и 60 минут после окончания инфузии кровезаменителя. В эти же периоды эксперимента производили

Таблица 1

Системная гемодинамика у крыс при геморрагическом шоке и инфузии физиологического раствора (серия 1-я), ФР в сочетании с L-аргиномом (серия 2-я и 3-я) или оксакомом (серия 4-я и 5-я), M ± m

| Показатели  | Серии | Исх.          | Окончание кровопотери    | После инфузии                  |                                |
|---|-------|---------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|   |       |               |                          | 10 мин                         | 60 мин                         |
| АД, мм рт.ст.   | 1     | 139 ± 2       | 56 ± 4 <sup>+</sup>      | 101 ± 3 <sup>+#</sup>          | 98 ± 3 <sup>+#</sup>           |
|   | 2     | 135 ± 4       | 54 ± 6 <sup>+</sup>      | 100 ± 4 <sup>+#</sup>          | 100 ± 5 <sup>+#</sup>          |
|   | 3     | 139 ± 6       | 48 ± 6 <sup>+</sup>      | 102 ± 5 <sup>+#</sup>          | 91 ± 6 <sup>+#</sup>           |
|   | 4     | 144 ± 6       | 61 ± 8 <sup>+</sup>      | 104 ± 5 <sup>+#</sup>          | 109 ± 7 <sup>+#</sup>          |
|   | 5     | 138 ± 5       | 58 ± 8 <sup>+</sup>      | 87 ± 4 <sup>+#</sup>           | 98 ± 5 <sup>+#</sup>           |
| МОК, мл/мин × 100 г                                     | 1     | 15,4 ± 0,2    | 4,5 ± 0,4 <sup>+</sup>   | 13,6 ± 0,5 <sup>+#</sup>       | 12,1 ± 0,7 <sup>+#</sup>       |
|   | 2     | 15,1 ± 0,3    | 5,5 ± 0,7 <sup>+</sup>   | 20,7 ± 1,7 <sup>+#*</sup>      | 18,2 ± 1,3 <sup>+#*</sup>      |
|   | 3     | 15,2 ± 0,4    | 5,4 ± 0,5 <sup>+</sup>   | 24,1 ± 2,2 <sup>+#x</sup>      | 23,5 ± 2,0 <sup>+#x</sup>      |
|   | 4     | 15,3 ± 0,2    | 5,3 ± 0,8 <sup>+</sup>   | 26,0 ± 2,0 <sup>+#@</sup>      | 21,2 ± 1,2 <sup>+#@</sup>      |
|   | 5     | 14,0 ± 0,5    | 4,5 ± 0,5 <sup>+</sup>   | 16,3 ± 0,8 <sup>+#&amp;°</sup> | 16,7 ± 1,6 <sup>+#&amp;°</sup> |
| УО, мл/мин × кг   | 1     | 0,36 ± 0,01   | 0,13 ± 0,01 <sup>+</sup> | 0,37 ± 0,02                    | 0,34 ± 0,02                    |
|   | 2     | 0,38 ± 0,01   | 0,18 ± 0,01 <sup>+</sup> | 0,52 ± 0,03 <sup>+#*</sup>     | 0,47 ± 0,03 <sup>+#*</sup>     |
|   | 3     | 0,39 ± 0,02   | 0,17 ± 0,02 <sup>+</sup> | 0,66 ± 0,06 <sup>+#x</sup>     | 0,60 ± 0,07 <sup>+#x</sup>     |
|   | 4     | 0,37 ± 0,01   | 0,15 ± 0,02 <sup>+</sup> | 0,63 ± 0,05 <sup>+#@</sup>     | 0,50 ± 0,03 <sup>+#@</sup>     |
|   | 5     | 0,35 ± 0,0222 | 0,14 ± 0,01 <sup>+</sup> | 0,43 ± 0,03 <sup>+#&amp;</sup> | 0,42 ± 0,04 <sup>+#&amp;</sup> |
| ОПС, дин × с × см <sup>-5</sup> / кг × 10 <sup>-4</sup> | 1     | 7,3 ± 0,1     | 10,7 ± 0,8 <sup>+</sup>  | 6,1 ± 0,3 <sup>+#</sup>        | 7,0 ± 0,5 <sup>#</sup>         |
|   | 2     | 7,2 ± 0,3     | 9,4 ± 1,3 <sup>+</sup>   | 4,0 ± 0,2 <sup>+#*</sup>       | 4,7 ± 0,6 <sup>+#*</sup>       |
|   | 3     | 7,4 ± 0,3     | 7,5 ± 1,3                | 3,5 ± 0,2 <sup>+#x</sup>       | 3,3 ± 0,2 <sup>+#x</sup>       |
|   | 4     | 7,6 ± 0,3     | 9,1 ± 1,1 <sup>+</sup>   | 3,4 ± 0,4 <sup>+#@</sup>       | 4,2 ± 0,4 <sup>+#@</sup>       |
|   | 5     | 7,9 ± 0,2     | 11,2 ± 1,7 <sup>+</sup>  | 4,3 ± 0,3 <sup>+#°</sup>       | 5,0 ± 0,6 <sup>+#°</sup>       |
| РИЛЖ, кгм/мин × кг                                      | 1     | 290 ± 7       | 33 ± 3 <sup>+</sup>      | 188 ± 10 <sup>+#</sup>         | 165 ± 11 <sup>+#</sup>         |
|   | 2     | 274 ± 7       | 41 ± 7 <sup>+</sup>      | 280 ± 31 <sup>+#*</sup>        | 245 ± 16 <sup>+#*</sup>        |
|   | 3     | 283 ± 12      | 35 ± 5 <sup>+</sup>      | 337 ± 46 <sup>+#x</sup>        | 292 ± 31 <sup>+#x</sup>        |
|   | 4     | 299 ± 16      | 47 ± 9 <sup>+</sup>      | 359 ± 25 <sup>+#@</sup>        | 308 ± 18 <sup>+#@</sup>        |
|   | 5     | 262 ± 17      | 35 ± 5 <sup>+</sup>      | 196 ± 13 <sup>+#&amp;</sup>    | 234 ± 15 <sup>+#&amp;°</sup>   |

Примечание. Здесь и в последующих таблицах достоверность различий (p ≤ 0,05) по сравнению с исходными данными отмечена знаком <sup>+</sup>, с данными после окончания кровопотери — <sup>#</sup>; между данными 1 и 2 серии — <sup>\*</sup>; между данными 1 и 3 серии — <sup>x</sup>; между данными 1 и 4 серии — <sup>@</sup>; между данными 1 и 5 серии — <sup>°</sup>; между данными 4 и 5 серии — <sup>&</sup>.

измерение АД и УО и брали пробы артериальной крови для определения показателей КОС. Газы крови ( $pCO_2$ ) и кислотно-основное состояние (КОС) организма ( $pH$  и  $BE_a$ ) исследовали на анализаторе ABL-500 фирмы «Radiometer» (Дания). Результаты обработаны статистически. Программа «Statistica 7.0».

### Результаты и обсуждение

Кровопотеря приводила к снижению АД, уменьшению МОК (табл. 1). В 2—3 раза снижался ударный объем сердца. Число функционирующих капилляров в поле зрения составляло в сравнении с исходным 42—56%. Скорость движения эритроцитов в микрососудах слизистой оболочки тонкого кишечника замедлялась, а в ряде случаев наступал стаз. В капиллярах, где медленный кровоток сохранялся, появлялись агрегаты клеток крови. В крови отмечался метаболический ацидоз: снижался  $pH$ , возрастал дефицит буферных оснований, падало напряжение угольной кислоты.

Возмещение кровопотери ФР (серия 1) приводило к улучшению центральной гемодинамики (табл. 1). Через 10 и 60 мин после окончания инфузии АД повышалось. Возрастало УО, увеличивался МОК. ОПС возвращалось к исходным значениям. Скорость движения форменных элементов крови была ниже исходных значений (табл. 2). В большинстве капилляров через 10 и 60 мин после инфузии ФР наблюдались агрегаты эритроцитов. Полного восстановления капиллярного кровотока и дезагрегации

клеток крови не было отмечено ни в одном контрольном исследовании. Центральная гемодинамика и микроциркуляция под действием инфузии солевого раствора хотя и возрастала, но не возвращалась к исходным величинам.

КОС у крыс (табл. 3) значительно изменилось. Через 10 мин по окончании инфузии дефицит буферных оснований уменьшился почти в 2 раза по сравнению с состоянием перед началом инфузии, до исходных значений возросло напряжение угольной кислоты в артериальной крови.

Коррекция  $pH$  крови достигалась на 10-й мин наблюдения за счет уменьшения  $BE$ , но к 60-й мин после окончания инфузии сохранялся метаболический ацидоз в стадии дыхательной компенсации.

При предварительном введении L-аргинина (2-я серия) после возмещения массивной кровопотери ФР гемодинамика значительно улучшилась по сравнению с контрольной серией (табл. 1). Через 10 и 60 мин после окончания инфузии УО превосходил исходный в полтора раза, хотя АД повышалось в такой же степени, как и в контрольной серии. Соответственно росту УО, увеличивался МОК. Уменьшение ОПС в среднем на 40% после инфузии ( $p < 0,05$ ), скорее всего, было следствием действия L-аргинина, способствующего продукции NO и пополняющего его базальный уровень. РИЛЖ увеличивался и возвращался к исходному, что косвенно отражало возросшую сократительную способность сердечной мышцы.

В большинстве капилляров (серия 2) через 10 и 60 мин после окончания инфузии ФР количество аг-

Таблица 2

Микроциркуляция у крыс при геморрагическом шоке и инфузии ФР (серия 1), ФР в сочетании с L-аргинином (серия 2 и 3) или оксакомом (серия 4 и 5),  $M \pm m$

| Показатели                           | Серии | Исх.    | Окончание кровопотери     | После инфузии               |                             |
|--------------------------------------|-------|---------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                                      |       |         |                           | 10 мин                      | 60 мин                      |
| КФК в поле зрения, % от исх.         | 1     | 100 ± 0 | 51 ± 4 <sup>+</sup>       | 88 ± 4 <sup>#</sup>         | 97 ± 6 <sup>#</sup>         |
|                                      | 2     | 100 ± 0 | 55 ± 6 <sup>+</sup>       | 96 ± 3 <sup>#</sup>         | 97 ± 3 <sup>#</sup>         |
|                                      | 3     | 100 ± 0 | 43 ± 3 <sup>+</sup>       | 97 ± 3 <sup>#</sup>         | 97 ± 3 <sup>#</sup>         |
|                                      | 4     | 100 ± 0 | 60 ± 5 <sup>+</sup>       | 100 ± 0 <sup>#</sup>        | 100 ± 0 <sup>#</sup>        |
|                                      | 5     | 100 ± 0 | 45 ± 4 <sup>+</sup>       | 91 ± 4 <sup>#</sup>         | 92 ± 4 <sup>#</sup>         |
| Скорость движения эритроцитов, баллы | 1     | 0       | -3,63 ± 0,06 <sup>+</sup> | -0,89 ± 0,19 <sup>+#</sup>  | -0,89 ± 0,12 <sup>+#</sup>  |
|                                      | 2     | 0       | -3,30 ± 0,21 <sup>+</sup> | -0,70 ± 0,10 <sup>+#</sup>  | -0,80 ± 0,10 <sup>+#</sup>  |
|                                      | 3     | 0       | -3,71 ± 0,14 <sup>+</sup> | 0 ± 0 <sup>#x</sup>         | 0 ± 0 <sup>#x</sup>         |
|                                      | 4     | 0       | -3,11 ± 0,11 <sup>+</sup> | -0,44 ± 0,12 <sup>+#@</sup> | -0,44 ± 0,11 <sup>+#@</sup> |
|                                      | 5     | 0       | -3,00 ± 0,00 <sup>+</sup> | -0,50 ± 0,12 <sup>+#°</sup> | -0,38 ± 0,12 <sup>+#°</sup> |
| Агрегация эритроцитов, баллы         | 1     | 0       | 2,63 ± 0,12 <sup>+</sup>  | 1,00 ± 0,12 <sup>+#</sup>   | 1,06 ± 0,12 <sup>+#</sup>   |
|                                      | 2     | 0       | 2,40 ± 0,10 <sup>+</sup>  | 0,90 ± 0,10 <sup>+#</sup>   | 0,80 ± 0,21 <sup>+#</sup>   |
|                                      | 3     | 0       | 2,71 ± 0,16 <sup>+</sup>  | 0 ± 0 <sup>#x</sup>         | 0 ± 0 <sup>#x</sup>         |
|                                      | 4     | 0       | 2,11 ± 0,12 <sup>+</sup>  | 0,56 ± 0,11 <sup>+#</sup>   | 0,44 ± 0,12 <sup>+#@</sup>  |
|                                      | 5     | 0       | 2,00 ± 0 <sup>+</sup>     | 0,75 ± 0,12 <sup>+#</sup>   | 0,38 ± 0,12 <sup>+#°</sup>  |

регатив эритроцитов и скорость движения форменных элементов крови была такой же, как и в контроле (табл. 2), но несмотря на это, восстановление системной гемодинамики было стойким в отличие от контрольных опытов. Действие L-аргинина на кровообращение в целом связано, скорее всего, с влиянием NO на работоспособность миокарда [4, 5].

Значительное восстановление гемодинамики сопровождалось выраженной коррекцией кислотно-основного состояния. Через 10 мин по окончании инфузии дефицит буферных оснований уменьшился (табл. 3) и тенденция к снижению сохранилась через 60 мин, чего не наблюдалось в контроле. К 60-й минуте метаболический ацидоз в стадии дыхательной компенсации был менее выраженным по сравнению с таковым в контрольной серии.

При введении L-аргинина после кровопотери (3-я серия) восстанавливалась до исходных значений скорость движения эритроцитов по капиллярам и существенно снижалось количество агрегатов эритроцитов, что способствовало росту УО и МОК, снижению ОПС и высокому РИЛЖ. Так, если восстановление скорости кровотока в капиллярах в 1-й серии было отмечено только в 6 опытах из 19 (32%), то в 3-й серии — во всех 7 опытах (100%). Под влиянием аргинина улучшался не только капиллярный, но и системный кровоток. В 3-й серии МОК превышал исходный в 100% опытов, в контрольной — восстановление МОК до величин, близких к исходным, наблюдалось только в 3-х опытах из 19 (16%).

Таким образом, L-аргинин улучшает работу сердечной мышцы, нормализует нарушенную микроциркуляцию. Можно полагать, что основной эффект L-аргинина состоит в обеспечении адекватного количества субстрата для генерации NO. Механизм действия L-аргинина на сердце, возможно, связан с тем, что он защищает кардиомиоциты от действия свободных радикалов, что было продемонстрировано в экспериментах *in vitro* [6], поскольку аргинин через орнитин может превращаться в глютаминовую кислоту, обладающую антиоксидантной активностью.

Улучшение КОС при использовании L-аргинина в составе ФР было следствием более полного восстановления МЦ, чем при инфузии только ФР. В результате этого после окончания инфузии дефицит буферных оснований был ниже, а напряжение угольной кислоты выше в сравнении с контролем.

Применение оксакома до кровопотери и инфузии солевого раствора после кровопотери (серия 4) сопровождалось ростом АД (табл. 1). Увеличение УО и МОК, снижение ОПС и рост РИЛЖ были такими же как и в серии 2 и статистически значимо отличались от контроля.

Восстановление гемодинамики у животных этой серии способствовало выраженному уменьшению циркуляторной гипоксии, что нашло отражение в коррекции КОС (табл. 3). К 60-й минуте после окончания инфузии остаточный компенсированный метаболический ацидоз был таким же незначительным, как и у животных 2-й серии.

Таблица 3

Кислотно-основное состояние артериальной крови у крыс при геморрагическом шоке и инфузии ФР (серия 1), ФР в сочетании с L-аргинином (серия 2-я и 3-я) или оксакомом (серия 4-я и 5-я),  $M \pm m$

| Показатели                   | Серии | Исх.        | Окончание кровопотери    | После инфузии            |                          |
|------------------------------|-------|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                              |       |             |                          | 10 мин                   | 60 мин                   |
| pCO <sub>2</sub> , мм рт.ст. | 1     | 43,7 ± 0,9  | 24,5 ± 1,2 <sup>+</sup>  | 31,8 ± 0,7 <sup>+</sup>  | 27,7 ± 1,3 <sup>+</sup>  |
|                              | 2     | 40,6 ± 1,9  | 25,9 ± 1,5 <sup>+</sup>  | 30,8 ± 1,3 <sup>+</sup>  | 29,1 ± 2,5 <sup>+</sup>  |
|                              | 3     | 44,0 ± 2,6  | 30,5 ± 1,4 <sup>+</sup>  | 30,4 ± 1,4 <sup>+</sup>  | 30,8 ± 2,0 <sup>+</sup>  |
|                              | 4     | 42,5 ± 1,4  | 23,9 ± 1,6 <sup>+</sup>  | 28,5 ± 1,3 <sup>+</sup>  | 26,6 ± 1,6 <sup>+</sup>  |
|                              | 5     | 42,4 ± 0,9  | 25,2 ± 3,7 <sup>+</sup>  | 34,7 ± 3, 2 <sup>+</sup> | 33,9 ± 3,5 <sup>+</sup>  |
| рН                           | 1     | 7,39 ± 0,01 | 7,35 ± 0,02 <sup>+</sup> | 7,35 ± 0,03 <sup>+</sup> | 7,37 ± 0,03 <sup>+</sup> |
|                              | 2     | 7,41 ± 0,01 | 7,36 ± 0,02 <sup>+</sup> | 7,39 ± 0,01              | 7,41 ± 0,03              |
|                              | 3     | 7,39 ± 0,01 | 7,34 ± 0,02 <sup>+</sup> | 7,42 ± 0,02              | 7,41 ± 0,02              |
|                              | 4     | 7,41 ± 0,01 | 7,38 ± 0,02              | 7,41 ± 0,01              | 7,44 ± 0,03              |
|                              | 5     | 7,41 ± 0,01 | 7,36 ± 0,04              | 7,33 ± 0,03              | 7,33 ± 0,04              |
| BE, ммоль/л                  | 1     | 1,0 ± 0,4   | -11,5 ± 0,7 <sup>+</sup> | -7,0 ± 0,9 <sup>+</sup>  | -7,5 ± 1,2 <sup>+</sup>  |
|                              | 2     | 1,0 ± 0,6   | -10,1 ± 0,9 <sup>+</sup> | -5,9 ± 0,9 <sup>+</sup>  | -5,6 ± 1,1 <sup>+</sup>  |
|                              | 3     | 1,4 ± 0,8   | -8,9 ± 0,7 <sup>+</sup>  | -3,0 ± 1,1 <sup>+</sup>  | -3,5 ± 1,3 <sup>+</sup>  |
|                              | 4     | 1,1 ± 0,6   | -10,0 ± 1,1 <sup>+</sup> | -5,8 ± 0,7 <sup>+</sup>  | -5,7 ± 0,7 <sup>+</sup>  |
|                              | 5     | 2,1 ± 0,5   | -10,1 ± 0,9 <sup>+</sup> | -7,0 ± 1,1 <sup>+</sup>  | -7,5 ± 1,2 <sup>+</sup>  |

По-видимому, при профилактическом применении оксаком обратимо связывал эндогенный оксид азота, что способствовало более сохранному его расходованию при кровопотере и перемещению его в клетки и ткани при введении ФР. Высокая производительность сердечной мышцы у крыс этой серии и обеспечила восстановление кровообращения [7].

Инфузия после тяжелой кровопотери солевого раствора с оксаком в его составе (серия 5) так же, как и в 4-й, сопровождалась ростом АД (табл. 1). К 60-й минуте наблюдения УО и МОК были выше, чем в контроле. Скорость движения эритроцитов в капиллярах увеличилась и уменьшилось в поле зрения количество агрегатов (табл. 2), что, возможно, явилось одной из причин роста выживаемости животных при использовании доноров NO. В контрольной серии она составляла только 42%, во 2-й — 80%, в 3-й выжило 100% крыс, в 4-й — 78%, в 5-й — 75%.

На основании полученных результатов можно полагать, что доноры NO, вводимые до начала кровопотери, повышают устойчивость животных к геморрагическому шоку. L-аргинин и оксаком могут рассматриваться как перспективные кандидаты для применения в предоперационном периоде, а L-аргинин и в составе инфузионных сред при лечении геморрагического шока.

### Список литературы

1. Реутов В.П. Химическая природа эндотелиального фактора релаксации. *Успехи биологической химии*. 1995; 35: 189-228.
2. Карпинский В.В., Словеснов С.В., Рерих Р.А. Определение сердечного выброса у мелких лабораторных животных методом тетраполярной реографии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 1986; 1: 74-7.
3. Кочетыгов Н.И., Куликов А.М. Системная гемодинамика и микроциркуляция при лечении ожогового шока кровезамещающими растворами. *Проблемы гематологии и переливания крови*. 1982; 6: 24-30.

4. Angele M.K., Smail N., Wang P. et al. L-arginine restores the depressed cardiac output and regional perfusion after trauma — hemorrhage. *Surgery*. 1998; 124: 394-401.

5. Arora T.K., Malhotra A.K., Ivatury R., Mangino M.J. L-arginine infusion during resuscitation for hemorrhagic shock: impact and mechanism. *J. Trauma and Acute Care Surg*. 2012; 72(2): 397-402.

6. Nomani Y., Rao V., Shiono N. et al. Quenching the effects of L-arginine on free radical injury in cultured cardiomyocytes. *Surg. Today*. 1998; 28(4): 379-84.

7. Ремизова М.И., Кочетыгов Н.И., Гербут К.А., Ваннин А.Ф. Влияние динитрозильного комплекса железа с глутатионом как донора оксида азота на кровообращение у здоровых животных. *Биофизика*. 2008; 53(35): 867-73.

### References

1. Reutov V.P. The chemical nature of endothelial derived relaxing factor. *Advances of Biological Chemistry*. 1995; 35: 189-228. (in Russian)

2. Karpinskiy V.V., Slovesnjv S.V., Pepikh R.A. Definitive cardiac output from small laboratory animals by tetrapolar rheography. *Pathological physiology and experimental therapy*. 1986; 1: 74-7. (in Russian)

3. Kochetygov N.I., Kulikov A.M. Systemic hemodynamics and microcirculation in the treatment of burn shock blood substitutes solutions. *Problems of Hematology and Blood Transfusion*. 1982; 6: 24-30. (in Russian)

4. Angele M.K., Smail N., Wang P. et al. L-arginine restores the depressed cardiac output and regional perfusion after trauma — hemorrhage. *Surgery*. 1998; 124: 394-401.

5. Arora T.K., Malhotra A.K., Ivatury R., Mangino M.J. L-arginine infusion during resuscitation for hemorrhagic shock: impact and mechanism. *J. Trauma and Acute Care Surg*. 2012; 72(2): 397-402.

6. Nomani Y., Rao V., Shiono N. et al. Quenching the effects of L-arginine on free radical injury in cultured cardiomyocytes. *Surg. Today*. 1998; 28(4): 379-84.

7. Remizova M.I., Kochetygov N.I., Gerbout K.A., Vannin A.F. Effect of the donor of nitric oxide, dinitrosyl iron complex with glutathione, on blood circulation in healthy animals. *Biophysics*. 2008; 53(35): 867-73. (in Russian)

Поступила 29.01.14

Received 29.01.14

### Сведения об авторах:

Гербут Константин Андреевич, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. группы экспериментальной трансфузиологии отдела кровезаменителей и компонентов крови ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России

Гришина Галина Викторовна, науч. сотр. группы экспериментальной трансфузиологии отдела кровезаменителей и компонентов крови ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России

Нагорная Клавдия Николаевна, вед. инженер-программист группы экспериментальной трансфузиологии отдела кровезаменителей и компонентов крови ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России

Решетняк В.К., Кукушкин М.Л., Гурко Н.С.

## Значение корково-подкорковых структур мозга в восприятии острой и хронической боли

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

*В обзоре представлены современные данные литературы о роли коры и подкорковых структурах мозга в восприятии острой и хронической боли. Обсуждается значение различных областей мозга в восприятии дискриминативных и аффективных компонентов боли. Обсуждаются также гендерные различия восприятия боли, зависящие от функциональной активности коры мозга и антиноцицептивных подкорковых структур. Анализируются морфологические изменения корковых и подкорковых структур мозга при хронических болевых синдромах. Доказывается, что уменьшение объема серого и белого вещества коры мозга и подкорковых структур является следствием, а не причиной формирования хронических болевых синдромов. Рассматриваются особенности активации и деактивации определенных областей коры мозга при острой и хронической боли.*

**Ключевые слова:** восприятие острой и хронической боли, кора головного мозга, таламус, антиноцицептивные подкорковые структуры, объем серого вещества, объем белого вещества

Reschetniak V.K., Kukushkin M.L., Gurko N.S.

## The importance of the cortex and subcortical structures of the brain in the perception of acute and chronic pain

Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 125315, Moscow, Baltijskaa, 8

*This review presents the current data in the literature about the importance of the cortex and subcortical structures of the brain in the perception of acute and chronic pain. Discussed the importance of various areas of the brain in perception discriminative and affective components of pain. Discusses also gender differences in pain perception depending on the functional activity of brain cortex and antinociceptive subcortical structures. Analyzed the morphological changes of cortical and subcortical structures of the brain in chronic pain syndromes. It is proved that the decrease in the volume of gray and white matter of cerebral cortex and subcortical structures is a consequence and not the cause of chronic pain syndrome. Discusses the features activate and deactivate certain areas of the cortex of the brain in acute and chronic pain. Analyzed same features the activation of several brain structures in migraine and cluster headache.*

**Key words:** perception of acute and chronic pain, cortex of the brain, thalamus, antinociceptive subcortical structures, volume of gray matter, volume of white matter

Проблема борьбы с болью до настоящего времени остается важной не только медико-биологической, но и социально-экономической проблемой [1]. Восприятие боли всегда субъективно и зависит от целого ряда факторов. Оно зависит от места и характера повреждения, от психологического состояния человека, его возраста и жизненного опыта, культурных, социальных, этнических и религиозных особенностей личности [2—5].

Боль — понятие многокомпонентное. Оно включает в себя:

- перцептуально-дискриминативный компонент, позволяющий определить место повреждения;

- эмоционально-аффективный компонент, формирующий неприятное психоэмоциональное переживание;

- двигательный компонент, направленный на устранение действия повреждающего фактора;

- вегетативный компонент, отражающий рефлекторные изменения работы внутренних органов и тонуса симпатoadренальной системы;

- когнитивный компонент, формирующий субъективное отношение к испытываемой в данный момент боли на основе предшествующего опыта [6].

Кроме того восприятие ноцицептивной афферентации существенно различается при нанесении болевого раздражения у бодрствующего и спящего индивидуума [7, 8].

Необходимо подчеркнуть также, что, рассматривая такое многокомпонентное понятие, как боль, сле-

**Для корреспонденции:** Решетняк Виталий Кузьмич, д.м.н., проф., член-кор. РАН, зав. лаб. общей патологии нервной системы ФГБНУ «НИИ ОПП», e-mail: VKR46@yandex.ru



дует иметь в виду двойственное биологическое значение боли. Она может быть полезна, сигнализируя о повреждении организма (физиологическая боль) и может выступать как, безусловно, патологический фактор, являясь самостоятельной хронической формой болезни [9].

Как это ни парадоксально, но значение коры больших полушарий мозга в механизмах восприятия боли долгое время недооценивалось или даже отрицалось. После опубликования в 1920 г. работы известного невролога Хэда [10], изучавшего клинические проявления таламического болевого синдрома, ведущее значение в патофизиологических механизмах восприятия боли придавалось ядрам медиального таламуса. Мнение о том, что кора больших полушарий мозга не участвует в формировании болевого восприятия, получило дальнейшее развитие после того, как классики нейрофизиологии Пенфилд и Расмуссен в 1950 г. опубликовали результаты своего исследования, в котором было установлено, что при стимуляции моторной и соматосенсорной областей коры только в 1% случаев возникает болевое ощущение у пациентов [11]. В дальнейших клинических исследованиях было установлено, что удаление соматосенсорной области коры мозга не приводит к снижению интенсивности хронической боли [12]. Результаты этих клинических, а также экспериментальных исследований привели к тому, что до 80-х годов прошлого столетия некоторые авторы недооценивали значение коры больших полушарий мозга и, в частности соматосенсорных областей в восприятии и модуляции боли. Так, например, Бишоп [13] считал, что соматосенсорная область коры не имеет существенного значения в перцепции боли. Аналогичного мнения придерживался Стиммел [14]. В своей монографии опубликованной в 1983 г. он приводит схему, на которой таламус, получая проекции из спиноталамического тракта, даже не посылает свои ноцицептивные проекции в кору больших полушарий. Недооценка роли коры больших полушарий в восприятии и модуляции боли сказалась также и при разработке представлений о механизмах действия антиноцицептивной системы мозга. На широко известной схеме антиноцицептивной системы предложенной Басбаумом и Филдсом не представлена кора больших полушарий мозга, и все взаимодействия антиноцицептивных структур замыкаются на периакведуктальном сером веществе [15].

Вопреки всем вышеупомянутым данным достаточно давно было показано, что стимуляция соматосенсорной области коры мозга вызывает боль у пациентов, страдающих болевыми синдромами [16]. Расхождения между результатами этих исследований и наблюдениями Пенфилда и его сторонников объясняется тем, что они проводили свои исследования у па-

циентов, не страдавших болевыми синдромами. В тех случаях, когда у пациентов имеется хроническая боль, стимуляция коры вызывает боль. Причем ощущение боли возникает только при раздражении того участка соматосенсорной коры, который соответствует зоне представительства болевой конечности [17]. Такой же феномен был показан не только для коры, но и для подкорковых структур. У пациентов с хронической болью стимуляция медиального таламуса вызывала болевые ощущения, а у пациентов, оперируемых по другому поводу (дискинезии), раздражение данной подкорковой структуры не давало болевых ощущений [18]. Одним из аргументов сторонников В. Пенфилда и Б. Бишопа являлся тот факт, что в экспериментальных исследованиях не обнаруживались ноцицептивные нейроны в коре головного мозга [19]. Однако затем последовала целая серия работ, в которых были обнаружены ноцицептивные нейроны в первой соматосенсорной области коры больших полушарий (S1) у крыс [20], кошек [21, 22] и обезьян [23]. В дальнейших исследованиях удалось обнаружить ноцицептивные нейроны и во второй соматосенсорной области коры больших полушарий у кошек [24]. Удалось показать также, что после перерезки седалищного нерва болевой синдром у крыс возникает только в том случае, когда в патологический процесс, вызванный деафферентацией, вовлекается кора больших полушарий. В противном случае хронический болевой синдром не развивается [25].

Об участии коры головного мозга в восприятии боли свидетельствуют также клинические и лабораторные исследования, в которых было показано, что амплитуда соматосенсорных вызванных потенциалов при ноцицептивной стимуляции у людей коррелирует с интенсивностью болевого ощущения [26—28]. Первое сообщение о вызванных соматосенсорных потенциалах, возникающих в коре головного мозга при коротком болевом раздражении, появилось в 1964 г. [29]. В дальнейшем использование этого метода позволило получить целый ряд данных, свидетельствующих об усилении электрической активности различных областей коры мозга при электрическом или лазерном болевом раздражении [30—32].

В начале 90-х годов появился принципиально новый метод исследования головного мозга человека с использованием позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ). Эти исследования, несмотря на некоторые различия в полученных результатах, показали, что при тепловом ноцицептивном раздражении кожи активируется целый ряд корковых и подкорковых структур у здоровых индивидуумов [33—35].

В дальнейшем было проведено много исследований выполненных с помощью ПЭТ и магнитно-резонансной томографии (МРТ), которые подтвердили

факт того, что при тепловом болевом раздражении кожи активируется ряд корковых и подкорковых структур. Обычно активируются обе соматосенсорные области: первая (S1) и вторая (S2). Есть все основания считать, что эти области ответственны за восприятие сенсорного компонента боли [36—38]. Интенсивность боли зависит от уровня активации таламуса, передней цингулярной области коры, островка, областей S1 и S2 [39].

Другие области в задней париетальной коре, такие, как интрапариетальная борозда и нижняя париетальная долька также обнаруживают индивидуальные различия в чувствительности к боли, привлекая внимание к наносимому болевому раздражению [40].

В большинстве исследований с использованием ПЭТ и МРТ показано также, что при тепловом ноцицептивном раздражении кожи у здоровых добровольцев происходит активация передней цингулярной и инсулярной областей коры головного мозга. Эти два корковых образования входят состав лимбической системы мозга и ответственны за восприятие аффективного компонента боли [41—43].

Этими методами было установлено также, что префронтальная и париетальная ассоциативная области коры мозга, активируются при тепловом ноцицептивном раздражении и могут быть связаны с когнитивными процессами, такими, как память или оценка раздражителя [36, 44]. Методом ПЭТ было установлено, что при болевом раздражении происходит также активация таких подкорковых структур, как таламус, базальные ганглии и мозжечок [45]. Исследования, выполненные с помощью регистрации вызванных потенциалов, и данные полученные с помощью ПЭТ и МРТ исследований, хорошо согласуются и взаимодополняют друг друга. Сопоставление результатов этих исследований позволяет лучше понять динамику взаимодействия всех корково-подкорковых структур, составляющих нейроматрикс, обеспечивающий восприятие различных компонентов боли. В частности, внутрикорковая регистрация биоэлектрической активности мозга у человека показала, что при болевом раздражении прежде всего активируется вторая соматосенсорная область S2 [46, 47]. Дальнейшие исследования подтвердили тот факт, что область S2 и соседствующая с ней инсулярная кора получают ноцицептивную информацию раньше, чем другие области коры мозга [48]. По мнению некоторых исследователей, инсулярная кора играет важную роль не только в сенсорном восприятии боли, но и в привлечении внимания индивидуума к месту нанесения ноцицептивного раздражения [49]. Тот факт, что область S2 и инсулярная кора получают не только ноцицептивную, но и неноцицептивную информацию раньше других областей коры мозга, был достаточно

давно установлен нами в острых и хронических экспериментах на кошках. В этих же экспериментах было показано, что активация области S2 и инсулярной коры вызывает реакцию внимания у животного, в отличие от стимуляции области S1 [21]. В области S1 у человека имеется соматотопическое представление боли, соответствующее тактильным входам (гомункулус). В S2 нет четкой соматотопической представленности как тактильной, так и болевой чувствительности [50]. Следует подчеркнуть, что при тепловом ноцицептивном раздражении отмечается билатеральная активация второй соматосенсорной области и островка. Первая соматосенсорная область активируется контралатерально. Таламус активируется ипсилатерально [51]. Островок анатомически гетерогенен. Его задние отделы больше связаны с сенсорным восприятием боли. А передние отделы анатомически теснее связаны с префронтальной корой и вследствие этого ответственны за восприятие эмоционального, когнитивного компонентов и за запоминание боли. При нанесении болевых стимулов после ранней активации S2 и затем островка отмечается активация S1 и передней цингулярной области коры [52, 53]. Более длительная латентность активации этой структуры дает основание считать, что она ответственна за восприятие психоэмоционального компонента боли [50]. Передняя цингулярная область коры постоянно активируется при нанесении ноцицептивных стимулов различной модальности и при регистрации различными методами. Предполагается, что ее роstralная часть ответственна за аффективные реакции, а когнитивные процессы осуществляются в средне-цингулярной области и вокруг дополнительной моторной области.

В некоторых случаях в восприятии сенсорно-дискриминативного компонента боли принимают участие нижняя париетальная и премоторная области коры [54] и отмечается также активация дополнительной моторной области [51]. Активация дополнительной моторной и премоторной областей коры менее выражена по сравнению с другими вышеупомянутыми областями коры и предполагается, что это проявление болевого эпифеномена, направленного или на подавление движений, или, наоборот, на инициацию движений в ответ на болевое раздражение. Активация моторной области может быть лишь отражением активации области S1, так же, как плохо выраженная активация дополнительной моторной области может быть обусловлена активацией средней части цингулярной области коры.

Болевые стимулы вызывают не только активацию ряда областей мозга, но также и деактивацию некоторых областей коры: медиальной префронтальной ко-

ры, задней поясной коры и прекилиновидного участка коры [36, 55, 56].

Медиальная ноцицептивная система медленная (полисинаптическая) не имеющая соматотопической организации, осуществляет восприятие аффективных компонентов боли. Она состоит из медиальных ядер таламуса, цингулярной, инсулярной, префронтальной, нижней париетальной, энторинальной и премоторной областей коры, а также таких подкорковых структур, как амигдала и гиппокамп [43, 57—59]. Сравнительно недавно Д. Прайсом была предложена новая модель взаимодействия между различными компонентами болевого восприятия, которая описывает два пути аффективного восприятия боли. Вдобавок к вышеупомянутым путям активации различных корковых структур, участвующих в восприятии дискриминативного и аффективного компонентов боли, описан кортико-лимбический путь. Он проходит от С1 и С2 к инсулярной, париетальной, периренальной областям коры, к амигдале, и к гиппокампу и в конечном итоге конвергирует в тех же структурах, которые прямо активируются таламо-корковыми путями. Этот второй путь интеграции боли сочетается с информацией, поступающей из других сенсорных систем, так же как из систем обучения, памяти и когнитивных функций. Данный вид интеграции обеспечивает вторичную оценку боли в контексте переживания и ожидания боли, которую Д. Прайс назвал «вторичным аффектом» [57]. Префронтальная, орбито-фронтальная и энторинальная области коры также имеют важное значение в восприятии вторичного аффекта или когнитивной оценке боли [43, 54, 60].

Такое современное представление о параллельной и последовательной интеграции (вторичный аффект) поступающих ноцицептивных сигналов приближает нас к пониманию корково-подкорковых механизмов восприятия и модуляции боли при сосредоточении и отвлечении внимания от ноцицептивной стимуляции, при воспоминаниях о предшествующей боли, при анагетическом эффекте плацебо и при ожидании болевого раздражения.

Таким образом, результаты исследований, проведенных в последние годы, свидетельствуют, что в восприятии различных компонентов боли участвует большое количество корковых и подкорковых структур, составляющих сложную систему нейроматрикса, обеспечивающего параллельное и последовательное поступление ноцицептивной информации в целый ряд корковых структур мозга. Кроме того, большинство корковых образований имеет билатеральные ноцицептивные входы. Поскольку боль является результатом интеграции процессов, протекающих в таком матриксе, то неудивительно, что удаление одного из образований этого матрикса не дает очевидного эф-

фекта, если другие структуры матрикса компенсируют его отсутствие. Эти параллельные процессы, вероятно, обеспечивают надежные резервные возможности ноцицептивной системы, имеющей важное биологическое значение для выживания организма.

Как уже было сказано выше, на индивидуальную чувствительность к боли могут влиять психологические и социальные факторы. Кроме этих факторов, причиной различий в восприятии боли могут быть также генетические, морфофункциональные различия в корковых областях мозга, участвующих в восприятии боли и ответственных за сенсорную перцепцию, сенсомоторную интеграцию, модуляцию боли, аффективный и когнитивный контроль [39]. Морфометрические исследования свидетельствуют, что объем и плотность серого вещества головного мозга зависят от пола [61], возраста [62] и этнической принадлежности [63].

Установлено, что первая соматосенсорная область, передняя цингулярная кора и префронтальная кора сильнее активируются у людей, более чувствительных к боли, чем у людей, менее чувствительных. У более чувствительных людей толщина серого вещества в этих областях коры меньше, чем у менее чувствительных. Вариабельность толщины серого вещества может быть обусловлена различным объемом клеток, плотностью дендритов, кровотоком и интерстициальной жидкостью [64]. В другом исследовании было также показано, что морфологические различия мозга действительно играют роль в восприятии соматической боли у здоровых людей во всей популяции [65]. Аналогичные данные получены и при исследовании индивидуальных морфологических различий мозга и различий в восприятии не только боли, но и температурной чувствительности у здоровых людей [64, 66].

Увеличенная чувствительность к боли может быть фактором риска для последующего развития хронической боли в дальнейшей жизни. Например, было показано, что пациенты с фибромиалгией имеют повышенную чувствительность к боли и повышенное «взвинчивание» боли [67]. Другие исследования подтвердили это предположение. В них было показано, что у пациентов с хронической болью понижены болевые пороги при нанесении болевых стимулов в лабораторных условиях [68—70].

В то же время морфометрические исследования мозга показали, что болевая стимуляция может приводить к кратковременным и длительным изменениям морфологии мозга. Было установлено, что болевая стимуляция, осуществляемая в течение 8 сут., значительно увеличивает объем серого вещества в соматосенсорных областях коры и в среднем отделе цингулярной коры. При этом происходит снижение болевой чувствительности параллельно с увеличением

объема серого вещества в SI. Через год эти изменения объема серого вещества не обнаруживаются, т.е. структуры мозга возвращаются к исходному уровню при отсутствии болевой стимуляции [71]. От объема серого вещества мозга зависит не только соматическая, но и висцеральная болевая чувствительность. У здоровых женщин было установлено, что увеличение ректальной болевой чувствительности существенно коррелировало со снижением объема серого вещества билатерально в ядрах переднего таламуса (более выражено в правом таламусе), билатерально в передних и задних отделах островка, в заднем отделе цингулярной коры, в правой вендролатеральной и орбитофронтальной частях префронтальной коры, билатеральной миндалине и в правых базальных ганглиях.

Эти данные свидетельствуют, что от объема серого вещества существенно зависит индивидуальное восприятие висцеральной боли, включая как сенсорно-дискриминативный компонент, так и аффективно-мотивационные и когнитивные аспекты восприятия боли. Эти различия в восприятии боли у здоровых людей могут быть основой для возникновения патологической хронической абдоминальной боли и висцеральной гипералгезии у людей с повышенной висцеральной чувствительностью [39]. Авторы подчеркивают также роль цингулярной коры, от объема серого вещества которой зависит не только болевая, но и температурная чувствительность. Они предполагают, что эти морфологические особенности индивидуальной висцеральной чувствительности при возникновении абдоминальной боли могут сочетаться с другими факторами, такими, как аффективные расстройства, длительность заболевания, как это имеет место и при других видах боли.

У пациентов с хронической болью различного генеза отмечается не только снижение болевых порогов, но и снижение адаптации к болевым раздражениям [72—75]. Было установлено, что адаптация к болевым стимулам, наносившимся в течение 8 сут., ассоциируется с повышением активности (подколенной области) субгенуальной области передней цингулярной коры [76, 77]. Эти данные дают основание предполагать связь этой области коры с антиноцицептивной системой при адаптации к болевой стимуляции.

Известно, что болевые пороги и толерантность к боли у женщин ниже, чем у мужчин. Женщины чаще и сильнее страдают от хронических болевых синдромов [78]. Этот феномен частично можно объяснить морфологическими различиями строения женского и мужского мозга. В настоящее время показано, что толщина серого вещества целого ряда корковых и подкорковых образований у женщин разного возраста больше, чем у мужчин того же возраста [79, 80]. Известно, что объем мужского мозга на 10% превы-

шает объем женского мозга, однако сравнение большого количества женских и мужских образцов мозга одинакового объема также показало большую толщину серого вещества у женщин [81]. В другом исследовании также показаны гендерные различия в морфометрии ряда областей мозга мужчин и женщин [82]. Следует отметить, что в период менструального цикла в зависимости от уровня половых гормонов, и у женщин, применяющих контрацептивы, отмечается вариация не только болевой чувствительности, но также и объема серого вещества [83]. Мужские половые гормоны, в частности тестостерон, также влияют на объем серого вещества мозга [84].

Гендерные различия восприятия боли обусловлены также разным уровнем активации ряда корково-подкорковых структур мозга. При нанесении стандартных болевых стимулов у женщин более выражена активация средней части цингулярной коры, префронтальной коры, островка и таламуса. Это свидетельствует, что у женщин сильнее активируются участки мозга, получающие информацию по медиальным ноцицептивным путям. Это подтверждает предположение, что у женщин восприятие боли сильнее связано с эмоциональным компонентом боли [85]. Об этом же свидетельствует тот факт, что при болевом раздражении у женщин активируется передняя цингулярная кора — область, связанная с сенсорным и аффективным восприятием боли, а у мужчин больше активируются орбито-фронтальная и медиальная префронтальная области коры. Эти области ответственны за оценку и торможение негативного аффекта. Вероятно, поэтому неприятное восприятие боли у женщин выражено сильнее [86]. Существенные гендерные различия в восприятии боли обусловлены также и тем обстоятельством, что у мужчин сильнее активируется антиноцицептивная система. Показано, что при интенсивной боли у мужчин сильнее активируется центральное серое вещество, более значительно, чем у женщин, усиливаются связи между этой центральной антиноцицептивной структурой и амигдалой, подушкой и хвостатым ядром. Кроме того, у женщин отмечается меньший объем белого вещества в среднем мозге, что свидетельствует о меньшей мощности нисходящих трактов, осуществляющих нисходящий тормозный контроль боли [87].

В другой работе установлено, что структурные связи подколенной области передней цингулярной коры (ответственной за адаптацию к болевым стимулам) с периакведуктальным серым веществом, таламусом, передней частью срединной цингулярной коры и миндалиной у мужчин и женщин аналогичны. В то же время субгенуальная область цингулярной коры у женщин имеет более выраженные функциональные связи с периакведуктальным серым веществом, ядра-

ми шва, медиальным таламусом и передней частью срединной цингулярной корой. У мужчин более выражены связи с передней долей островка височно-теменным сочленением коры и с гипоталамусом [88]. Таким образом, в основе гендерных различий восприятия боли лежат не только генетические, гормональные, социальные, когнитивные, но и морфофункциональные различия корково-подкорковых структур головного мозга человека.

Интенсивные исследования, проводимые на животных и человеке, свидетельствуют, что хроническая боль ассоциируется с реорганизацией периферической и центральной нервной системы проявляющейся рядом нейрональных и глиальных изменений [89]. В частности, исследования человеческого мозга свидетельствуют об изменении его функциональной активности и морфологии при хронической боли [90]. Экспериментальная боль у здоровых индивидуумов и клиническая хроническая боль различны, но активируют одни и те же корковые области. Как уже было сказано, у здоровых людей ноцицептивная информация поступает через спиноталамические пути к SI, SII, островку, передней цингулярной области коры. При хронической боли снижается афферентация через этот путь и, соответственно, активация этих областей коры. В противоположность этому активность префронтальной коры увеличивается при хронической боли. Поскольку другие пути, кроме спиноталамического, такие, как спинопарабрахиальный, спиногипоталамический и спиноретикулярный, могут активировать префронтальную область коры, предполагается, что эти тракты могут становиться более значимыми при наличии хронической боли [91].

Стриатум, получающий проекции практически от всех корковых областей, обычно не активируется при экспериментальных болевых раздражениях. Однако показана его активация при невралгии, фибромиалгии, комплексном регионарном болевом синдроме. При хронической боли важное значение имеет активация и взаимодействие между префронтальной корой, островком, цингулярной извилиной, стриатумом и таламусом [92]. Как уже было сказано выше, болевые стимулы вызывают деактивацию медиальной префронтальной коры, задней поясной коры и преклиновидного участка коры. Следует подчеркнуть, что у пациентов страдающих хроническими болевыми синдромами эти области коры значительно меньше деактивируются по сравнению со здоровыми людьми [93]. Предполагается, что особое значение для хронизации боли имеет изменение функционального взаимодействия между медиальной частью префронтальной области коры и стриатумом [94], а также изменение функционального взаимодействия этого участка коры с гиппокампом [95, 96].

Большинство хронических болевых синдромов не проявляется активацией специфических только для них областей мозга. Однако при приступе мигрени происходит активация среднего мозга и моста, а при приступе кластерной головной боли активация гипоталамуса [97—100]. Эти наблюдения в комплексе со знаниями о механизмах этих видов боли могут свидетельствовать о важности нейроваскулярной этиологии, а не о первичных васкулярных механизмах.

Недавно были получены интересные данные о циклическом изменении функциональной активности целого ряда структур мозга в течение дня. Эти исследования были выполнены на пациентах с хроническим болевым синдромом «горящего рта». Было установлено, что утром, когда жгучая боль наименее выражена, отмечается незначительное взаимодействие между медиальной частью префронтальной области коры с цингулярной и окципитальной корой, вентромедиальной областью префронтальной коры, и билатерально с гиппокампом и миндалиной. В середине дня, когда интенсивность боли становится максимальной, отмечается значительное усиление взаимодействия между медиальной частью префронтальной области коры и другими вышеперечисленными структурами [96].

Помимо особенностей изменения функциональной активности различных структур мозга при хронической боли, у пациентов с хроническими болевыми синдромами отмечаются структурные изменения в областях мозга, участвующих в восприятии и модуляции боли [101—103].

Показано, что пациенты с хронической болью имеют снижение объема серого вещества в областях коры, связанных с восприятием боли [65, 104]. Эти изменения различны при каждом болевом синдроме, но перекрываются в цингулярной коре, орбитофронтальной коре и инсулярной области, а также в dorsal rons.

Например, часто встречаются изменения в объеме/плотности серого вещества в таламусе, цингулярной коре и инсулярной коре и других областях мозга при мигрени [105—108], при головной боли напряжения [43, 109] и при хронической лицевой боли [110]. Снижение объема серого вещества в коре отмечается также при хронической боли в спине [94, 111—113], комплексном региональном болевом синдроме [112, 114—116] у пациентов с фибромиалгией [117—120], с темпорамандибулярным болевым синдромом [121—123] и с остеоартритом [124, 125].

При хронических болевых синдромах висцерального генеза также отмечается снижение объема серого вещества мозга. Этот феномен имеет место при синдроме раздраженной кишки [126—128], хроническом панкреатите [129, 130], хронической тазовой боли у мужчин [131, 132] и хронической тазовой боли

у женщин [133], при вульводинии [134], циклической менструальной боли [135] и болезни Крона [136].

При всех вышеупомянутых хронических болевых синдромах наиболее часто снижение объема серого вещества отмечается в цингулярной коре, островке, в височной доле, в префронтальной коре, а также в таламусе и в базальных ганглиях [101, 137]. Большой интерес представляют данные о том, что у пациентов с нейропатической болью происходит не только снижение объема серого вещества в соматосенсорном таламусе, но и значительное снижение уровня ГАМК [138]. Как известно, этот тормозный нейромедиатор играет ведущую роль в механизмах восприятия боли, и снижение его уровня в структурах мозга, безусловно, является одним из ведущих патогенетических механизмов хронической боли. Подробно о роли ГАМК в патогенезе болевых синдромов см. в обзоре [139].

Морфофункциональные изменения структуры мозга имеют довольно сложный неоднородный, мозаичный характер. Наряду со снижением объема серого вещества в вышеупомянутых структурах при хронической боли отмечается увеличение объема серого вещества в ряде корковых и подкорковых образований мозга. Такое увеличение отмечается в передней цингулярной области коры, в заднем отделе островка, области SI, а также в некоторых участках базальных ганглиев и в гиппокампе [112, 121, 128, 134].

В частности, в ряде работ показано, что при хронической боли различного генеза одновременно происходит снижение объема серого вещества в медиальной области префронтальной коры и увеличение — серого вещества в гиппокампе [96, 137]. Иными словами, при хронических болевых синдромах происходит как снижение, так и увеличение объема серого вещества в различных структурах мозга в зависимости от их функционального значения в совместной деятельности нейроматрикса, ответственного за восприятие боли. Так, совсем недавно в специальном сравнительном исследовании было показано, что у женщин, страдающих синдромом раздраженного кишечника, происходит снижение объема серого вещества билатерально в переднем отделе фронтальной борозды, билатерально в островке и в средней части борозды орбито-фронтальной коры, в левой цингулярной коре, левой прямой извилине, а также билатерально в миндалине, билатерально в гиппокампе, в стволе мозга и в левой подушке. Одновременно с этим происходит увеличение объема серого вещества в постцентральной извилине [140].

Объем белого вещества также изменяется при хронической боли параллельно с изменением функциональной активности и реорганизацией серого вещества [92]. Структурные изменения белого вещества

показаны при комплексном региональном болевом синдроме [114], кластерной головной боли [141], синдроме раздраженного кишечника [142], темпоромандибулярных нарушениях [143] и фибромиалгии [118].

Первоначально, после установления факта снижения объема серого вещества у пациентов с хронической болью некоторые исследователи полагали, что хроническая боль является прогрессирующим заболеванием. Однако в дальнейшем было доказано, что изменения серого вещества у пациентов с хронической болью имеют обратимый характер. Восстановление объема серого вещества после прекращения болевого синдрома отмечается у пациентов с остеоартритами [124], после излечения хронической боли в спине [94, 144].

Было показано, что снижение толщины слоя серого вещества является следствием хронической боли, а не её причиной [125]. Установлено также, что уменьшение объема серого вещества мозга является следствием болевого воздействия, и эти изменения объема исчезают после прекращения поступления ноцицептивной информации как при острой боли, так и хронической в случае ее успешного лечения [43]. Пока нет окончательного ответа на вопрос, почему у одних пациентов развивается хроническая боль, а у других с такими же причинами, вызвавшими первоначальную боль, не происходит ее хронизация. Недавно было показано, что в тех случаях, когда у пациенток с эндометриозом отмечается увеличение объема серого вещества в среднем мозге (периакведуктальном сером веществе) и в правой префронтальной коре, то есть структурах модулирующих боль, болевой синдром отсутствует [133]. Следовательно, можно сделать предварительный вывод о том, что хронизация боли зависит не только от гендерных, когнитивных, социальных, возрастных факторов, но и от постоянства и интенсивности ноцицептивного входа, эффективности антиноцицептивной системы и неадаптивной нейропластичности системы болевого восприятия.

Необходимо отметить, что для хронизации боли определенное значение имеет также состояние ГАМК-Кергической, опиатэргической, серотонинергической и других нейромедиаторных систем мозга [139, 144—148]. Однако анализ этих сведений не входит в задачу настоящего обзора.

Все вышеперечисленные данные, полученные в исследованиях на людях методами ПЭТ и МРТ, хорошо согласуются с мнением о ведущем значении коры головного мозга в восприятии боли, отсутствии единого болевого центра, различном функциональном значении ряда областей коры мозга и подкорковых структур при восприятии болевого раздражения [6], а также о ведущей роли коры головного мозга в процессе формирования хронических болевых синдромов [9].

## Список литературы

1. Яхно Н.Н., Кукушкин М.Л. Хроническая боль: Медико-биологические и социально-экономические аспекты. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2012; 9: 54-8.
2. Кукушкин М.Л., Табеева Г.Р., Подчуфарова Е.В. *Болевой синдром: патофизиология, клиника, лечение*. Ред. Н.Н.Яхно. Москва. ИМА-ПРЕСС. 2011; 72 с.
3. Осипова В.В. Психологические аспекты боли. С. 90 -105. В кн.: *Болевые синдромы в неврологической практике*. Ред. А.М. Вейн. М.: МЕДпресс. 1999; 372 с.
4. Coghill R.C. Individual differences in the subjective experience of pain: new insights into mechanisms and models. *Headache*. 2010; 50: 1531-5.
5. Nielsen C.S., Staud R., Price D.D. Individual differences in pain sensitivity: measurement, causation and consequences. *J Pain*. 2009; 10: 231-7.
6. Решетняк В.К., Кукушкин М.Л. *Боль: физиологические и патофизиологические аспекты. Актуальные проблемы патофизиологии* (избранные лекции). Под. ред. Б.Б.Мороза. М.: Медицина. 2001; 354-89.
7. Решетняк В.К. Взаимовлияние боли и сна. *Российский журнал боли*. 2013; 2: 42-48.
8. Решетняк В.К., Решетняк Д.В. Болевые синдромы и нарушения сна. *Патогенез*. 2013; 4: 22-31.
9. Кукушкин М.Л., Решетняк В.К. Хронический болевой синдром или боль как самостоятельная форма боли. *Патогенез* 2003; 1: 34-42.
10. Head H. *Studies in Neurology*. London: Oxford University Press. 1920; 2: Part 4. 333-862.
11. Penfield W., Rasmussen T. *The cerebral cortex of man: a clinical study of localization of function*. New York: Hafner. 1950; 248 p.
12. White J.C., Sweet W.H. *Pain and the neurosurgeon: a forty-year experience*. Springfield: Thomas. 1969; 237 p.
13. Bishop B.Y. Pain: its physiology and rationale for management. Part 1. Neuroanatomical substrate of pain. *Phys. Ther.* 1980; 60 (1): 13-20.
14. Stimmel B. *Pain, analgesia and addiction: the pharmacologic treatment of pain*. New York: Raven Press; 1983: 312 p.
15. Basbaum A.I., Fields H.L. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. *Ann. Neurol*; 1978 (4): 451-62.
16. Sano K. Intralaminar thalamotomy (thalamolaminotomy) and posteromedial hypothalamotomy in the treatment of intractable pain. *Progress in Neurological Surgery*. Basel: Karger. 1977; 8: 50-103.
17. Tasker R.R. *Deafferentation. Textbook of Pain*. Edinburgh, London, Melbourne, New York: Churchill Livingstone. 1984; 119 — 132.
18. Albe-Fessard D., Condes-Lara M., Sanderson P. et al. Tentative explanation of the special role played by the areas of paleospinothalamic projection in patients with deafferentation pain syndromes. *Neural. Mech. Pain. 16 th Annu. Symp. Intra Sci. Found*. New York. 1984; 167- 82.
19. Morse R.W., Adkins R.J., Towe A.L. Population and modality characteristics of neurons in coronal regions of somatosensory area 1 of the cat. *Exp. Neurol*. 1965; 11: 419-40.
20. Lamour Y., Willer J., Guilbaud G. Neuronal responses to noxious stimulation in the rat somatosensory cortex. *Neurosci. Lett*. 1982; 29: 35-40.
21. Решетняк В.К. Нейрофизиологические основы боли и рефлекторного обезболевания. В кн. *«Итоги науки и техники. Физиол. чел. и животных»*. Москва. 1985; 29: 39 -109;
22. Matsumoto N. Functional difference of tooth pulp-driven neurons in oral and facial areas of the somatosensory cortex (S1) of the cat. *Exp. Neurol*. 1984; 85: 437-51.
23. Kenhalo D.R., Perkins W.C. Organization on primate S1 cortical nociceptive neurons. *Pain*. 1984; 19: Suppl.2. S 312.
24. Кукушкин М.Л., Решетняк В.К. Влияние электроакупунктуры на характер изменения активности нейронов второй соматосенсорной области коры больших полушарий. *БЭБ и мед*. 1986; 11: 517-9.
25. Крыжановский Г.Н. Решетняк В.К., Кукушкин М.Л. и др. Электрическая активность в дорсальных рогах спинного мозга и соматосенсорной коре у крыс с развившимся и неразвившимся болевым синдромом после перерезки седалищного нерва. *БЭБ и мед*. 1993; 5: 461-3.
26. Абрамов Ю.Б. Отражение эмоционального восприятия боли в соматосенсорном вызванном ответе у животных и человека в состоянии бодрствования и общей анестезии. *Всероссийская конф. «Фармакологические аспекты обезболевания»* Л. 1983; 111 — 2.
27. Лившиц А.В., Соколова А.А., Хазанов И.Б. и др. Попытка объективизации боли и противоболевого эффекта при стимуляции задних столбов у больных с поражениями спинного мозга. *Вопросы нейрохирургии*. 1984; 6: 42-7.
28. Дуринян Р.А., Решетняк В.К., Василенко А.М. Исследование механизмов острой и хронической боли методом регистрации соматосенсорных вызванных потенциалов. В кн. *Принципы и механизмы деятельности мозга человека*. Ленинград. 1985; 2-4
29. Spreng M. Ichioka M. Langsame rindenpotentiale bei schmerzreizung am menschen. *Pflugers Arch*. 1964; 279: 121-32.
30. Tarkka I.M., Treede R.D. Equivalent electrical source analysis of pain-related somatosensory evoked potentials elicited by a CO2 laser. *J. Clin Neurophysiol*. 1993; 10: 513- 9.
31. Valleriani M., Restuccia D., Le Pera et al. Attention-related modification of ultra-late CO(2) laser evoked potentials to human trigeminal nerve stimulation. *Neurosci. Lett*. 2002; 329: 329 — 33.
32. Kanda M., Nagamine T., Ikeda A. et al. Primary somatosensory cortex is actively involved in pain processing in human. *Brain Res*. 2000; 853: 282 — 9.
33. Apkarian A.V., Stea R.A., Manglos S.H. et al. Persistent pain inhibits contralateral somatosensory cortical activity in humans. *Neurosci. Lett*. 1992; 140: 141-7.
34. Jones A.K., Brown W.D., Friston K.J. et al. Cortical and subcortical localization of response to pain in man using positron emission tomography. *Proc. R. Soc. Lond* . 1991; 244: 39 — 44.
35. Talbot J.D., Marret S., Evans A.C. et al. Multiple representations of pain in human cerebral cortex. *Science*. 1991; 251: 1355 -8.
36. Coghill R.C., Sang C.N., Maisog J.M., Iadarola M.J. Pain intensity processing within the human brain: a bilateral, distributed mechanism. *J. Neurophysiol*. 1999; 82: 1934-43.
37. Bushnell M.C., Duncan G.H., Hofbauer R.K. et al. pain perception: is there a role for primary somatosensory cortex? *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96: 7705-9.
38. Chen J.I., Ha B., Bushnell M.C. et al. Differentiating noxious- and innocuous-related activation of human soma-

tosensory cortices using temporal analysis of fMRI. *J. Neurophysiol.* 2002; 88: 464-74.

39. Emerson N.M., Zeidan F., Lobanov O. et al. Pain sensitivity is related to regional grey matter density. *Pain.* 2014; 155: 566-73.

40. Lobanov O.V., Quevedo A.S., Hadsel M.S., Kraft R.A., Coghill R.C. Frontoparietal mechanisms supporting attention to location and intensity of painful stimuli. *Pain.* 2013; 154: 1758 — 68.

41. Rainville P., Duncan G.H., Price D.D. et al. Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. *Science.* 1997; 277: 968 — 971.

42. Fulbright R.K., Troche C.J., Skudlarski P. et al. Functional MR imaging of regional brain activation associated with affective experience of pain. *AJR. Am. J Roentgenol.* 2001; 177: 1205-10.

43. May A. Structure equals function: Cortical correlates of pain. *Pain.* 2012; 153: 1551-2.

44. Strigo I.A., Duncan G.H., Boivin M. et al. Differentiation of visceral and cutaneous pain in the human brain. *J. Neurophysiol.* 2003; 89: 3294 — 303.

45. Jones A.K., Brown W.D., Friston K.J. et al. Cortical and subcortical localization of response to pain in man using positron emission tomography. *Proc. R. Soc. Lond.* 1991; 244: 39-44.

46. Lenz F.A., Rios M., Chau D. et al. Painful stimuli evoke potentials recorded from the parasympathetic cortex in humans. *J. Neurophysiol.* 1998; 80: 2077 — 2088.

47. Frot M., Rambaud L., Guenot M., Mauguier F. Intracortical recordings of early pain-related CO<sub>2</sub> — laser evoked potentials in the human second somatosensory (SII) area. *Clin. Neurophysiol.* 1999; 110: 133-45.

48. Craig A.D. How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Nat. Rev. Neurosci.* 2002; 3: 655-66.

49. Brooks J.C., Nurmikko T.J., Bimson W.E. et al. fMRI of thermal pain: effects of stimulus laterality and attention. *Neuroimage.* 2000;15: 293 — 301.

50. Apkarian A.V., Bushnell M.C., Treede R-D., Zubieta J-K. Human mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Europ. J. of Pain.* 2005; 9: 463 — 84.

51. Owen D.G., Bureau Y., Thomas A.W. et al. Quantification of pain-induced changes in cerebral blood flow by perfusion MRI. *Pain.* 2008; 136: 85 — 96.

52. Bentley D.E., Youell P.D., Jones A.K. Anatomical localization and intrasubject reproducibility of laser evoked potential source in cingulate cortex using a realistic head model. *Clin. Neurophysiol.* 2002; 113: 1352 — 6.

53. Peyron R., Frot M., Schneider F. et al. Role of operculoinsular cortices in human pain processing: converging evidence from PET, fMRI, dipole modeling and intracerebral recording of evoked potentials. *Neuroimage.* 2002; 17: 1336-46.

54. Janig W. Autonomic reaction in pain. *Pain.* 2012; 153: 733 — 735.

55. Seminowicz D.A., Davis K.D. Pain enhances functional connectivity of brain network evoked by performance of a cognitive task. *Neurophysiol.* 2007; 97: 3651 — 3659.

56. Kong J., Loggia M.L., Zyloney C., Tu P. Exploring the brain in pain: activations, deactivations and their relation. *Pain.* 2010; 148: 257 -267.

57. Price D.D., Hirsh A., Robinson M.E. Psychological modulation of pain. In: Basbaum A.L., Bushnell M.C. edi-

tors. *Science of Pain.* San Diego: Academic Press; 2009: 975 — 1002. 55.

58. Shackman A.J., Salomons T.V., Slagter H.F. et al. The integration of negative affect, pain and cognitive control in the cingulate cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 2011; 12: 154—67.

59. Tseng M-T., Chiang M-C., Yazhuo K. et al. Effect of aging on cerebral processing of thermal pain in the human brain. *Pain.* 2013; 154 : 2120-9.

60. Neugebauer V., Galhardo V., Maione S., Mackey S.C. Forebrain pain mechanisms. *Brain Res. Rev.* 2009; 60: 226-42.

61. Goldstein J.M., Seidman L.J., Horton N.J. et al. Normal sexual dimorphism of the adult human brain assessed by in vivo magnetic resonance imaging. *Cereb. Cortex.* 2001; 11: 490-7.

62. Good C.D., Johnsrude I.S., Ashburner J. Et al. A voxel-based morphometric study of ageing in 465 normal adult human brains. *Neuroimage.* 2001; 14: 21-36.

63. Chee M.W., Zheng H., Goh J.O., Park D., Sutton B.P. Brain structure in young and old East Asians and Westerners: comparisons of structural volume and cortical thickness. *J. Cogn. Neurosci.* 2011; 23: 1065 — 79.

64. Erpelding N., Moayed M., Davis K.D. Cortical thickness correlates of pain and temperature sensitivity. *Pain.* 2012; 153: 1602 — 9.

65. Ruscheweyh R., Deppe M., Lohmann H., Stehling C. Pain is associated with regional gray matter reduction in general population. *Pain.* 2011; 152: 904-11.

66. Erpelding N., Davis K.D. Neural underpinnings of behavioral strategies that prioritize either cognitive task performance or pain. *Pain.* 2013; 154: 2060-71.

67. Staud R., Robinson M.E., Vierck C.J. et al. *Rating of experimental pain pain-related negative affect predict clinical pain in patients with fibromyalgia syndrome.* 2003;105: 215—22.

68. Carli G., Suman A.L., Biasi G., Marcolongo R. Reactivity to superficial and deep stimuli in patients with chronic musculoskeletal pain. *Pain.* 2002; 100: 259-69.

69. Giesecke T., Gracely R.H., Grant M.A.B. et al. Evidence of augmented central pain processing in idiopathic chronic low back pain. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 613 — 623.

70. Petzke F., Clauw D.J., Ambrose K. et al. Increased pain sensitivity in fibromyalgia: effect of stimulus type and mode of presentation. *Pain.* 2003; 105: 403-13.

71. Teutsch S., Herken W., Bingel U., Shoell E., May A. Changes in brain gray matter due to repetitive painful stimulation. *Neuroimage.* 2008; 42: 845-9.

72. Flor H., Diers M., Birbaumer N. Peripheral and electrocortical responses to painful and non-painful stimulation in chronic pain patients, tension headache patients and healthy controls. *Neurosci. Lett.* 2004; 361: 147-50.

73. Bingel U., Herken W., Teutsch S., May A. Habituation to painful stimulation involves the antinociceptive system — a 1-year follow-up 10 participants. *Pain.* 2008; 140: 393-4.

74. Proetty C.A., Sandrini G., Fokin I.V. et al. Trigemino-facial reflex in primary headaches. *Cephalgia.* 2003; 23: 33-41.

75. Valeriani M., de Nommaso M., Restuccia D. et al. reduced habituation to experimental pain in migraine patients: a CO (2) laser evoked potential study. *Pain.* 2003; 105: 57 — 64.

76. Bingel U., Herken W., Teutsch S., May A. Habituation to painful stimulation involves the antinociceptive system — a 1-year follow-up 10 participants. *Pain.* 2008; 140: 393- 4.



77. Bingel U., Schoell E., Herken W. et al. Habituation to painful stimulation involves the antinociceptive system. *Pain*. 2007; 131: 21 — 30.
78. Решетняк В.К., Кукушкин М.Л. Возрастные и половые различия восприятия боли. *Клиническая геронтология*. 2003; 9 (6): 34-8.
79. Kan E. et al. Sex differences in cortical thickness mapped in 176 healthy individuals between 7 and 87 years of age. *Cereb. Cortex*. 2007; 17: 1550 -60.
80. Witelson S.F., Gleser I.I., Kigar D.L. *Women have greater of neurons in posterior temporal cortex*. 1995; 15(5): 3418-28.
81. Luders E., Gaser C., Narr L., Toga A.W. Why sex matters: Brain size independent differences in gray matter distribution men and women. *J. Neurosci*. 2009; 29(45): 14265-70.
82. Sacher J., Neumann J., Okon-Singer H., Gotowiec S. Sexual dimorphism in the human brain: evidence from neuroimaging. *Magn Reson Imaging*. 2013; 31: 366-75.
83. Bondt De., Jacquemyn Y., Van H.W., Sijbers J., Sunaert S. Regional gray matter volume differences and sex-gormone correlations as function of menstrual cycle phase and gormonal contraceptives use. *Brain Res*. 2013; 1530: 22 — 31.
84. Hofer P., Lansensberger R., Kasper S. Testosterone in the brain: neuroimaging findings and the potential role for neuropsychopharmacology. *Eur. Neuropsychopharmacol*. 2013; 23: 79 -88.
85. Goffaux P., Michaud K., Gaudreau J. et al. Sex differences in perceived pain are affected by an anxious brain. *Pain*. 2011; 152: 2065-73.
86. Girard-Tremblay L., Daigle K., Goffaux P. Sex differences in cortical responses to pain unpleasantness. *15-th World Congress of Clinicians. Granada 27 — 30 June*. 2012; PH 293.
87. Linnman C., Beucke J.-C., Jensen K.B. et al. Sex similarities and differences in pain-related periaqueductal gray connectivity. *Pain*. 2012; 153: 444 — 54.
88. Wang G., Erpelding N., Davis K.D. Sex differences in connectivity of the subgenual anterior cingulate cortex. *Pain*. 2014; 155: 755-63.
89. Basbaum A.L., Bautista D.M., Scherrer G., Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009; 139: 267 — 84.
90. Apkarian A.V., Baliki M.N., Geha P.Y. Towards a theory of chronic pain. *Prog. Neurobiol*. 2009; 87: 81 — 97.
91. Apkarian A.V., Hashmi J.A., Baliki M.N. Pain and the brain: specificity and plasticity of the brain in clinical chronic pain. *Pain*. 2011; 152:49 — 64.
92. Mansour A.R., Baliki M.N., Huang L. et al. Brain white matter structural properties predict transition to chronic pain. *Pain*. 2013;154: 2160- 8.
93. Baliki M.N., Geha P.Y., Apkarian A.V., Chialvo D.R. Beyond feeling: chronic pain hurts the brain, disrupting the default-mode network dynamics. *J. Neurosci*. 2008; 28: 1398-403.
94. Baliki M.N., Petre B., Torbey S. et al. Corticostriatal functional connectivity predict transition to chronic back pain. *Nat. Neurosci*. 2012; 15: 1117-9.
95. Maleki N., Beccera L., Brawn J. et al. Common hippocampal structural and functional changes in migraine. *Brain Struct. Funct*. 2013; 218: 903-312.
96. Khan S.A., Keaser M.L., Meiller N.F., Semnowicz D.A. Altered structure and function in the hippocampus and medial prefrontal cortex in patients with burning mous syndrome. *Pain*. 2014; 155: 1472- 80.
97. Leone M., Franzini A., Broggi G., May A., Busso- ne G. Long-term follow-up of bilateral hypothalamic stimulation for intractable cluster headache. *Brain*. 2004; 127: 225 -64.
98. May A., Bahra A., Buchel C. et al. PET and MRA findings in cluster headache and VRA in experimental pain. *Neurology*. 2000; 55: 1328 — 35.
99. Qiu E., Wang Y., Ma L. et al. Abnormal brain functional connectivity of the hypothalamus in cluster headache. *PLos One*. 2013; 8: 57896.
100. Vetrugno R., Pierangeli G., Leone M. et al. Effect on sleep of posterior hypothalamus stimulation in cluster headache. *Headache*. 2007; 47: 1085-90.
101. May A. Chronic pain may change the structure of the brain. *Pain*. 2008; 137: 7 — 15.
102. Baliki M.N., Schnitzer T.J., Bauer W.R., Apkarian A.V. Brain morphological signatures for chronic pain. *Plos One*. 2011; 6: 26010.
103. Moayedli M., Weissman-Fogel I., Salomons T.V. et al. Abnormal gray matter aging in chronic pain patients. *Brain Res*. 2012; 1456: 82 — 93.
104. Valet M., Gundel H., Sprenger T. et al. Patients with pain disorder show gray-matter loss in pain-processing structure: a voxel-based morphometric study. *Psychosom. Med*. 2009; 71: 49-56.
105. Schmidt-Wilcke T., Ganssbauer S., Neuner T. et al. Subtle grey matter changes between migraine patients and healthy controls. *Cephalalgia*. 2008; 28: 1 — 4.
106. Kim J.H., Suh S.I., Seol H.Y., Oh K. Regional gray matter changes in patients with migraine: a voxel-based morphometry study. *Cephalgia*. 2008; 28: 598 — 604.
107. Rocca M.A., Ceccarelli A., Falini A. et al. Brain gray matter changes in migraine patients with T2-visible lesions: a 3-T MRI study. *Stroke*. 2006; 37: 1765-70.
108. Valfre W., Rainero I., Berguei M., Pinessi L. Voxel-based morphometry reveals gray matter abnormalities in migraine. *Headache*. 2008; 48: 109 — 117.
109. Schmidt-Wilcke T., Leinisch E., Straube A. et al. Gray matter decrease in patients with chronic tension type headache. *Neurology*. 2005; 65: 1483 — 6.
110. Schmidt-Wilke T., Hierlmeier S., Leinisch E. Altered regional brain morphology in patients with chronic facial pain. *Headache*. 2010; 50: 1278-85.
111. Apkarian A.V., Sosa Y., Sonty S., Levy R.M. Chronic back pain is associated with decreased prefrontal and thalamic gray matter density. *J. Neurosci*. 2004; 24: 10410-5.
112. Mutso A.A., Radzicki D., Baliki M.N. et al. Abnormalities in hippocampal functioning with persistent pain. *J. Neurosci*. 2012; 32: 5747-56.
113. Schmidt-Wilke T., Leinisch E., Ganssbauer S. et al. Affective components and intensity of pain correlate with structural differences in gray matter in chronic back pain patients. *Pain*. 2006; 125: 89-97.
114. Geha P.Y., Baliki M.N., Harden R.N. et al. The brain in chronic CRPS pain: abnormal gray-white matter interactions in emotional and autonomic regions. *Neuron*. 2008; 60: 570-81.
115. Custin S.M., Peck C.C., Wilcox S.I. et al. Different pain, different brain: thalamic anatomy in neuropathic and non-neuropathic chronic pain syndromes. *J. Neurosci*. 2011; 31: 5956-64.
116. Custin S.M., Peck C.C., Cheney L.B. et al. Pain and plasticity: is chronic pain always associated with somatosen-

- sory cortex activity and reorganisation? *J. Neurosci.* 2012; 32: 14874-84.
117. Kuchinad A., Schweinhardt P., Seminowicz D.A., Wood P.B. Acceleration brain gray matter loss in fibromyalgia patients: premature aging of the brain? *J. Neurosci.* 2007; 27: 4004-7.
118. Lutz J., Jager L., de Quervain D. et al. White and gray matter abnormalities in the brain patients with fibromyalgia: a diffusion-tensor and volumetric imaging study. *Arthritis Rheum.* 2008; 58: 3960-9.
119. Burgner M., Gaubitz M., Konrad C. et al. Decreased gray matter volumes in the cingulo-frontal cortex and the amygdale in patients with fibromyalgia. *Psychosom. Med.* 2009; 71: 566-73.
120. Wood P.B., Glabus M.F., Simpson R., Paterson J.C. Changes in gray matter density in fibromyalgia: correlation with dopamine metabolism. *J. Pain.* 2009; 10: 609-18.
121. Moayed M., Weissman-Fogel L., Crawley A.P. et al. Contribution of chronic pain and neuroticism to abnormal forebrain gray matter in patients with temporomandibular disorder. *Neuroimage.* 2011; 55: 277-86.
122. Younger J.W., Shen Y.F., Goddard G., Mackey S.C. Chronic myofascial temporomandibular pain is associated with neural abnormalities in the trigeminal and limbic systems. *Pain.* 2010; 149: 222-8.
123. Gerstner G., Ichesco E., Quintero A., Schmidt-Wilcke T. Changes in regional gray and white matter volume in patients with myofascial-type temporomandibular disorders: voxel-based morphometry study. *J. Orofac. Pain.* 2011; 25: 99-106.
124. Gwilym S.E., Filippini N., Douaud G., Carr A.J., Tracey I. Thalamic atrophy associated with painful osteoarthritis of the hip is reversible after arthroplasty: a longitudinal voxel-based morphometric study. *Arthritis Rheum.* 2010; 62: 2930-40.
125. Rodrigues-Raecke R., Niemeier A., Ihle K. et al. Brain gray matter decrease in chronic pain is the consequence and not the cause of pain. *J. Neurosci.* 2009; 29: 13746-50.
126. Blankstein U., Chen J., Diamant N.E., Davis K.D. Altered brain structure in irritable bowel syndrome: potential contributions of pre-existing and disease-driven factors. *Gastroenterology.* 2010; 138: 1783-9.
127. Davis K.D., Pope G., Chen J., Kwan C.L., Crawley A.P., Diamant N.E. Cortical thinning in IBS: implications for homeostatic, attention, and pain processing. *Neurology.* 2008; 70: 153-4.
128. Seminowicz D.A., Labus J.S., Bueller J.A., Tiliusch K., Naliboff B.D., Bushnell M.C., Mayer E.A. Regional gray matter density changes in brains of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 2010; 139: 48 — 57.
129. Frokjaer J.B., Olesen S.S., Gram M. Altered brain microstructure assessed by diffusion tensor imaging in patients with chronic pancreatitis. *Gut.* 2011; 60: 155 -62.
130. Tertulino F.F., Goldman S.M., Ardengh J.C. et al. Differentiation of acute and chronic pancreatitis by diffusion-weighted magnetic resonance imaging (DW-MRI): a prospective study. *Gastroenterology.* 2012; 142: (S242-242).
131. Farmer M.A., Chanda M.L., Parks E.L., Baliki M.N., Apkarian A.V. Brain functional and anatomical changes in chronic prostatitis /chronic pelvic pain syndrome. *J. Urol.* 2011; 186: 117-24.
132. Mordasini L., Weisstanner C., Rummel C. et al. Chronic pelvic pain syndrome in men is associated with reduction of relative gray matter volume in the anterior cingulate cortex compared to healthy controls. *J. Urol.* 2012; 188: 2233 -7.
133. As-Sanie S., Harris R.E., Napadow V., Kim J., Neshewat G. Changes in regional gray matter volume in women with chronic pelvic pain: a voxel-based morphometry study. *Pain.* 2012; 153: 1006-14.
134. Schweinhardt P., Kuchinad A., Pukall C.F., Bushnell M.C. Increased gray matter density in young women with chronic vulvar pain. *Pain.* 2008; 140: 411-9.
135. Tu C.H., Niddam D.V., Chao H.T. et al. Brain morphological changes associated with cyclic menstrual pain. *Pain.* 2010; 150: 462-8.
136. Agostini A., Benuzzi F., Filippini N., Bertani A. New insights into the brain involvement in patients with Crohn's disease: voxel-based morphometry study. *Neurogastroenterol. Motil.* 2012; 25: 147-82.
137. Davis K.D., Moayed M. Central mechanisms of pain revealed through functional and structural MRI. *J. neuro-immune Pharmacol.* 2013; 8: 518 — 534.
138. Henderson L.A., Peck C.C., Peterson E.T. et al. Chronic pain: lost inhibition? *J. Neurosci.* 2013; 33: 7574-82.
139. Кукушкин М.Л., Игонькина С.И. Значение ГАМК в патогенезе болевых синдромов. *Патол. физиол. и эксперимент. тер.* 2014; 1: 68-78.
140. Labus J.S., Dinov I.D., Jiang Z. et al. Irritable bowel syndrome in female patients is associated with alterations in structural brain networks. *Pain.* 2014; 155: 137- 49.
141. Teepker M., Menzler K., Belke M. et al. Diffusion tensor imaging in episodic cluster headache. *Headache.* 2012; 52: 274 -82.
142. Chen J.Y., Blankstein U., Diamant N.F., Davis K.D. White matter abnormalities in irritable bowel syndrome and relation to individual factors. *Brain Res.* 2011; 1392: 121-31.
143. Moayed M., Weissman-Fogel L., Salomons T.V. et al. White matter brain and trigeminal nerve abnormalities in temporomandibular disorder. *Pain.* 2012; 153: 1467-77.
144. Basbaum A.J., Fields H.L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathway and endorphin circuitry. *Annu. Rev. Neurosci.* 1984; 7: 309-38.
145. Beits A.J. The sites of origin brain stem neurotensin and serotonin projections to the rodent nucleus raphe magnus. *Pain.* 1992; 2: 829-42.
146. Spetea M., Rydelis G., Nylander I. et al. Alteration in endogenous opioid systems due to chronic inflammatory pain conditions. *Eur. J. Pharmacol.* 2002; 435: 245-52.
147. Графова В.Н., Карганов М.Ю. Анальгетические эффекты пептидных факторов спинного мозга крыс при формировании и развитии в нем генераторов патологически усиленного возбуждения. *Бюлл. эксперимент. биол. и мед.* 1994;10: 374-7.
148. Jones A.K.P., Cunningham V.J., Ha K.S. et al. Changes in central opioid receptor binding in relation to inflammation and pain patients with rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.* 1994; 33: 909 — 16.

## Reference

1. Jahno N.N., Kukushkin M.L. Chronic pain: Medico-biological and socio-economic aspects. *Vestnik Russian academiі medicinskih nauk.* (in Russian) 2012; 9: 54-8.
2. Kukushkin M.L., Tabeeva G.R., Podchufarova E.V. *Pain syndrome: pathophysiology, clinical course, treatment.* Ed. N.N. Jahno. Moscow. IMA PRESS. 2011; 72 p. (in Russian)

3. Osipova V.V. Psychological aspects of pain. P. 90 -105. In book.: *Pain syndromes in neurological practice*. Ed. A.M. Vein. M.: MEDpress. 1999; 372 p. (in Russian)
4. Coghill R.C. Individual differences in the subjective experience of pain: new insights into mechanisms and models. *Headache*. 2010; 50: 1531 — 5.
5. Nielsen C.S., Staud R., Price D.D. Individual differences in pain sensitivity: measurement, causation and consequences. *J Pain*. 2009; 10: 231 — 7.
6. Reschetniak V.K., Kukushkin M.L. *Pain: physiological and pathophysiological aspects. Aktualnie problemi pathophysiology (izbrannie lektsii)*. Ed. B.B.Moroz. M.: Medicina. 2001; 354 — 89. (in Russian)
7. Reschetniak V.K. The interaction between pain and sleep. *Rossiyskij jurnal boli*. 2013; 2: 42-8. (in Russian)
8. Reschetniak V.K. Reschetniak D.V. Pain syndromes and disturbance of sleep. *Pathogenes*. 2013; 4: 22-31. (in Russian).
9. Kukushkin M.L. Reschetniak V.K. Chronic pain syndrome or pain as separate form of the disease. *Pathogenes*. 2003; 1: 34 — 42. (in Russian)
10. Head H. *Studies in Neurology*. — London: Oxford University Press. 1920; 2: Part 4. 333 — 862.
11. Penfield W., Rasmussen T. The cerebral cortex of man: a clinical study of localization of function. — New York: Hafner. 1950; 248 p.
12. White J.C., Sweet W.H. *Pain and the neurosurgeon: a forty-year experience* Springfield: Thomas. 1969; 237 p.
13. Bishop B.Y. Pain: its physiology and rationale for management. Part 1. Neuroanatomical substrate of pain. *Phys. Ther.* 1980; 60 (1): 13 -20.
14. Stimmel B. *Pain, analgesia and addiction: the pharmacological treatment of pain*. New York: Raven Press; 1983: 312 p.
15. Basbaum A.I., Fields H.L. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. *Ann. Neurol*; 1978 (4): 451 — 62.
16. Sano K. Intralaminar thalamotomy (thalamolaminotomy) and posteromedial hypothalamotomy in the treatment of intractable pain. *Progress in Neurological Surgery. Basel: Karger*. 1977; 8: 50 — 103.
17. Tasker R.R. *Deafferentation*. Textbook of Pain. — Edinburg, London, Melburn, New York: Churchill Livingstone. 1984; 119 — 32.
18. Albe-Fessard D., Condes-Lara M., Sanderson P. et al. Tentative explanation of the special role played by the areas of paleospinothalamic projection in patients with deafferentation pain syndromes. *Neural. Mech. Pain*. 16 th Annu. Symp. Intra Sci. Found. — New York. 1984; 167 — 82.
19. Morse R.W., Adkins R.J., Towe A.L. Population and modality characteristics of neurons in coronal regions of somatosensory area I of the cat. *Exp. Neurol*. 1965; 11: 419 — 40.
20. Iamour Y., Willer J., Guilbaud G. Neuronal responses to noxious stimulation in the rat somatosensory cortex. *Neurosci. Lett*. 1982; 29: 35 — 40.
21. Reschetniak V.K. Neurophysiological basis of pain and reflex anesthesia. In book. «Itogi nauki i tehnici. Physiologia cheloveka i zivotnih». Moskva. 1985; 29: 39 -109; (in Russian)
22. Matsumoto N. Functional difference of tooth pulp-driven neurons in oral and facial areas of the somatosensory cortex (S1) of the cat. *Exp. Neurol*. 1984; 85: 437 — 51.
23. Kenhalo D.R., Perkins W.C. Organization on primate S1 cortical nociceptive neurons. *Pain*. 1984; 19: Suppl.2. S 312.
24. Kukushkin M.L., Reschetniak V.K. Influence of cupuncture on the nature of changes in the activity of the second somatosensory area of the cerebral cortex. *Bulleten experimentalnoi biologii i medicini*. 1986; 11: 517-9. (in Russian)
25. Krizanovsky G.N., Reschetniak V.K., Kukushkin M.L. The electrical activity in the dorsal horns of the spinal cord and cortex in rats with developed and undeveloped pain syndrome after transection of the sciatic nerve. *Bulleten experimentalnoi biologii i medicini*. 1993; 5: 461-3. (in Russian)
26. Abramov U.B. The reflection of the emotional pain in somatosensory evoked response in animals and humans in the waking state and general anesthesia. *Vsesousnaa konferencia «Farmacologicheskie aspekti obezbolivania»* L. 1983; 111 — 2. (in Russian)
27. Livchic AV., Sokolova A.A., Chazanov I.B. Attempt ob- jectification of pain and analgesic effect during stimulation of the posterior columns in patients with lesions of the spinal cord. *Voprosi neurochirurgii*. 1984; 6: 42 — 47. (in Russia).
28. Durinian R.A., Reschetniak V.K., Vasilenko A.M. Investigation of the mechanisms of acute and chronic pain by method of registration of evoked potentials. In book. *Principi i mehanis- mi deatelnosti mozga cheloveka*. L 1985; 2-4. (in Russian)
29. Spreng M., Ichioka M. Langsame rindenpotentiale bei schmerzreizung am menschen. *Pflugers Arch*. 1964; 279: 121—32.
30. Tarkka I.M., Treede R.D. Equivalent electrical source analysis of pain-related somatosensory evoked potentials elicited by a CO2 laser. *J. Clin Neurophysiol*. 1993; 10: 513 — 9.
31. Valleriani M., Restuccia D., Le Pera. et al. Attention-related modification of ultra-late CO(2) laser evoked potentials to human trigeminal nerve stimulation. *Neurosci. Lett*. 2002; 329: 329 — 33.
32. Kanda M., Nagamine T., Ikeda A. et al. Primary somatosensory cortex is actively involved in pain processing in human. *Brain Res*. 2000; 853: 282 — 9.
33. Apkarian A.V., Stea R.A., Manglos S.H. et al. Persistent pain inhibits contralateral somatosensory cortical activity in humans. *Neurosci. Lett*. 1992; 140: 141 -7.
34. Jones A.K., Brown W.D., Friston K.J. et al. Cortical and subcortical localization of response to pain in man using positron emission tomography. *Proc. R. Soc. Lond*. 1991; 244: 39 — 44.
35. Talbot J.D., Marret S., Evans A.C. et al. Multiple representations of pain in human cerebral cortex. *Science*. 1991; 251: 1355-8.
36. Coghill R.C., Sang C.N., Maisog J.M., Iadarola M.J. Pain intensity processing within the human brain: a bilateral, distributed mechanism. *J. Neurophysiol*. 1999; 82: 1934 — 43.
37. Bushnell M.C., Duncan G.H., Hofbauer R.K. et al. pain perception: is there a role for primary somatosensory cortex? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96: 7705 — 7709.
38. Chen J.I., Ha B., Bushnell M.C. et al. Differentiating noxious- and innocuous-related activation of human somatosensory cortices using temporal analysis of fMRI. *J. Neurophysiol*. 2002; 88: 464 — 74.
39. Emerson N.M., Zeidan F., Lobanov O. et al. Pain sensitivity is related to regional grey matter density. *Pain*. 2014; 155: 566 — 73.
40. Lobanov O.V., Quevedo A.S., Hadsel M.S., Kraft R.A. Coghill R.C. Frontoparietal mechanisms supporting attention to location and intensity of painful stimuli. *Pain* 2013; 154: 1758 — 68.
41. Rainville P., Duncan G.H., Price D.D. et al. Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. *Science*. 1997; 277: 968 — 971.
42. Fulbright R.K., Troche C.J., Skudlarski P. et al. Functional MR imaging of regional brain activation associated

with affective experience of pain. *AJR. Am. J Roentgenol.* 2001; 177: 1205 — 10.

43. May A. Structure equals function: Cortical correlates of pain. *Pain.* 2012; 153: 1551 — 2.

44. Strigo I.A., Duncan G.H., Boivin M. et al. Differentiation of visceral and cutaneous pain in the human brain. *J. Neurophysiol.* 2003; 89: 3294 — 303.

45. Jones A.K., Brown W.D., Friston K.J. et al. Cortical and subcortical localization of response to pain in man using positron emission tomography. *Proc. R. Soc. Lond.* 1991; 244: 39 — 44.

46. Lenz F.A., Rios M., Chau D. et al. Painful stimuli evoke potentials recorded from the parasympathetic cortex in humans. *J. Neurophysiol.* 1998; 80: 2077 — 88.

47. Frot M., Rambaud L., Guenot M., Mauguier F. Intracortical recordings of early pain-related CO<sub>2</sub> — laser evoked potentials in the human second somatosensory (SII) area. *Clin. Neurophysiol.* 1999; 110: 133 — 45.

48. Craig A.D. How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Nat. Rev. Neurosci.* 2002; 3: 655 — 66.

49. Brooks J.C., Nurmikko T.J., Bimson W.E. et al. fMRI of thermal pain: effects of stimulus laterality and attention. *Neuroimage.* 2000; 15: 293 — 301.

50. Apkarian A.V., Bushnell M.C., Treede R-D., Zubieta J-K. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Europ. J. of Pain.* 2005; 9: 463 — 84.

51. Owen D.G., Bureau Y., Thomas A.W. et al. Quantification of pain-induced changes in cerebral blood flow by perfusion MRI. *Pain.* 2008; 136: 85 — 96.

52. Bentley D.E., Youell P.D., Jones A.K. Anatomical localization and intrasubject reproducibility of laser evoked potential source in cingulate cortex using a realistic head model. *Clin. Neurophysiol.* 2002; 113: 1352 — 16.

53. Peyron R., Frot M., Schneider F. et al. Role of operculo-insular cortices in human pain processing: converging evidence from PET, fMRI, dipole modeling and intracerebral recording of evoked potentials. *Neuroimage.* 2002; 17: 1336-46.

54. Janig W. Autonomic reaction in pain. *Pain.* 2012; 153: 733 — 735.

55. Seminowicz D.A., Davis K.D. Pain enhances functional connectivity of brain network evoked by performance of a cognitive task. *Neurophysiol.* 2007; 97: 3651-9.

56. Kong J., Loggia M.L., Zyloney C., Tu P. Exploring the brain in pain: activations, deactivations and their relation. *Pain.* 2010; 148: 257 -267.

57. Price D.D., Hirsh A., Robinson M.E. Psychological modulation of pain. In: Basbaum A.L., Bushnell M.C. editors. *Science of Pain.* San Diego: Academic Press; 2009: 975 — 1002. 55.

58. Shackman A.J., Salomons T.V., Slagter H.F. et al. The integration of negative affect, pain and cognitive control in the cingulate cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 2011; 12: 154 — 67.

59. Tseng M-T., Chiang M-C., Yazhuo K. et al. Effect of aging on cerebral processing of thermal pain in the human brain. *Pain.* 2013; 154 : 2120 — 2129.

60. Neugebauer V., Galhardo V., Maione S., Mackey S.C. Forebrain pain mechanisms. *Brain Res. Rev.* 2009; 60: 226 — 42.

61. Goldstein J.M., Seidman L.J., Horton N.J. et al. Normal sexual dimorphism of the adult human brain assessed by in vivo magnetic resonance imaging. *Cereb. Cortex.* 2001; 11: 490-7.

62. Good C.D., Johnsrude I.S., Ashburner J. Et al. A voxel-based morphometric study of ageing in 465 normal adult human brains. *Neuroimage.* 2001; 14: 21 — 36.

63. Chee M.W., Zheng H., Goh J.O., Park D., Sutton B.P. Brain structure in young and old East Asians and

Westerners: comparisons of structural volume and cortical thickness. *J. Cogn. Neurosci.* 2011; 23: 1065 — 79.

64. Erpelding N., Moayed M., Davis K.D. Cortical thickness correlates of pain and temperature sensitivity. *Pain.* 2012; 153: 1602 — 9.

65. Ruscheweyh R., Deppe M., Lohmann H., Stehling C. Pain is associated with regional gray matter reduction in general population. *Pain.* 2011; 152: 904 — 11.

66. Erpelding N., Davis K.D. Neural underpinnings of behavioral strategies that prioritize either cognitive task performance or pain. *Pain.* 2013; 154: 2060-71.

67. Staud R., Robinson M.E., Vierck C.J. et al. Rating of experimental pain pain-related negative affect predict clinical pain in patients with fibromyalgia syndrome. 2003;105: 215 — 22.

68. Carli G., Suman A.L., Biasi G., Marcolongo R. Reactivity to superficial and deep stimuli in patients with chronic musculoskeletal pain. *Pain.* 2002; 100: 259 — 69.

69. Giesecke T., Gracely R.H., Grant M.A.B. et al. Evidence of augmented central pain processing in idiopathic chronic low back pain. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 613 — 23.

70. Petzke F., Clauw D.J., Ambrose K. et al. Increased pain sensitivity in fibromyalgia: effect of stimulus type and mode of presentation. *Pain.* 2003; 105: 403 — 13.

71. Teutsch S., Herken W., Bingel U., Shoell E., May A. Changes in brain gray matter due to repetitive painful stimulation. *Neuroimage.* 2008; 42: 845-9.

72. Flor H., Diers M., Birbaumer N. Peripheral and electrocortical responses to painful and non-painful stimulation in chronic pain patients, tension headache patients and healthy controls. *Neurosci. Lett.* 2004; 361: 147 — 150.

73. Bingel U., Herken W., Teutsch S., May A. Habituation to painful stimulation involves the antinociceptive system — a 1-year follow-up 10 participants. *Pain.* 2008; 140: 393 — 4.

74. Proetty C.A., Sandrini G., Fokin I.V. et al. Trigemino-facial reflex in primary headaches. *Cephalgia.* 2003; 23: 33 — 41.

75. Valeriani M., de Nommaso M., Restuccia D. et al. reduced habituation to experimental pain in migraine patients: a CO (2) laser evoked potential study. *Pain.* 2003; 105: 57 — 64.

76. Bingel U., Herken W., Teutsch S., May A. Habituation to painful stimulation involves the antinociceptive system — a 1-year follow-up 10 participants. *Pain.* 2008; 140: 393 — 4.

77. Bingel U., Schoell E., Herken W. et al. Habituation to painful stimulation involves the antinociceptive system. *Pain.* 2007; 131: 21 — 30.

78. Reschetniak V.K., Kukushkin M.L. Age and gender differences in pain perception. *Klinicheskaya gerontologia.* 2003; 9 (6): 34 — 8. (in Russian)

79. Kan E. et al. Sex differences in cortical thickness mapped in 176 healthy individuals between 7 and 87 years of age. *Cereb. Cortex.* 2007; 17: 1550 -1560.

80. Witelson S.F., Gleser I.I., Kigar D.L. Women have greater of neurons in posterior temporal cortex. 1995; 15(5): 3418 -28.

81. Luders E., Gaser C., Narr L., Toga A.W. Why sex matters: Brain size independent differences in gray matter distribution on men and women. *J. Neurosci.* 2009; 29(45): 14265 — 70.

82. Sacher J., Neumann J., Okon-Singer H., Gotowiec S. Sexual dimorphism in the human brain: evidence from neuroimaging. *Magn Reson Imaging.* 2013; 31: 366 — 75.

83. Bondt De., Jacquemyn Y., Van H.W., Sijbers J., Sunaert S. Regional gray matter volume differences and sex-gormone correlations as function of menstrual cycle phase and gormonal contraceptives use. *Brain Res.* 2013; 1530: 22 — 31.

84. Hofer P., Lansenberger R., Kasper S. Testosterone in the brain: neuroimaging findings and the potential role for

- neuropsychopharmacology. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2013; 23: 79–88.
85. Goffaux P., Michaud K., Gaudreau J. et al. Sex differences in perceived pain are affected by an anxious brain. *Pain.* 2011; 152: 2065–73.
86. Girard-Tremblay L., Daigle K., Goffaux P. Sex differences in cortical responses to pain unpleasantness. 15-th World Congress of Clinicians. Granada 27–30 June 2012; PH 293.
87. Linnman C., Beucke J.-C., Jensen K.B. et al. Sex similarities and differences in pain-related periaqueductal gray connectivity. *Pain.* 2012; 153: 444–54.
88. Wang G., Erpelding N., Davis K.D. Sex differences in connectivity of the subgenual anterior cingulate cortex. *Pain.* 2014; 155: 755–63.
89. Basbaum A.L., Bautista D.M., Scherrer G., Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell.* 2009; 139: 267–284.
90. Apkarian A.V., Baliki M.N., Geha P.Y. Towards a theory of chronic pain. *Prog. Neurobiol.* 2009; 87: 81–97.
91. Apkarian A.V., Hashmi J.A., Baliki M.N. Pain and the brain: specificity and plasticity of the brain in clinical chronic pain. *Pain.* 2011; 152:49–64.
92. Mansour A.R., Baliki M.N., Huang L. et al. Brain white matter structural properties predict transition to chronic pain. *Pain.* 2013;154: 2160–8.
93. Baliki M.N., Geha P.Y., Apkarian A.V., Chialvo D.R. Beyond feeling: chronic pain hurts the brain, disrupting the default-mode network dynamics. *J. Neurosci.* 2008; 28: 1398–403.
94. Baliki M.N., Petre B., Torbey S. et al. Corticostriatal functional connectivity predict transition to chronic back pain. *Nat. Neurosci.* 2012; 15: 1117–9.
95. Maleki N., Beccera L., Brawn J. et al. Common hippocampal structural and functional changes in migraine. *Brain Struct. Funct.* 2013; 218: 903–312.
96. Khan S.A., Keaser M.L., Meiller N.F., Seminowicz D.A. Altered structure and function in the hippocampus and medial prefrontal cortex in patients with burning mouth syndrome. *Pain.* 2014; 155: 1472–80.
97. Leone M., Franzini A., Broggi G., May A., Bussone G. Long-term follow-up of bilateral hypothalamic stimulation for intractable cluster headache. *Brain.* 2004; 127: 2259–2264.
98. May A., Bahra A., Buchel C. et al. PET and MRA findings in cluster headache and VRA in experimental pain. *Neurology.* 2000; 55: 1328–35.
99. Qiu E., Wang Y., Ma L. et al. Abnormal brain functional connectivity of the hypothalamus in cluster headache. *PLoS One.* 2013; 8: 57896.
100. Vetrugno R., Pierangeli G., Leone M. et al. Effect on sleep of posterior hypothalamus stimulation in cluster headache. *Headache.* 2007; 47: 1085–90.
101. May A. Chronic pain may change the structure of the brain. *Pain.* 2008; 137: 7–15.
102. Baliki M.N., Schnitzler T.J., Bauer W.R., Apkarian A.V. Brain morphological signatures for chronic pain. *PLoS ONE.* 2011; 6: 26010.
103. Moayed M., Weissman-Fogel I., Salomons T.V. et al. Abnormal gray matter aging in chronic pain patients. *Brain Res.* 2012; 1456: 82–93.
104. Valet M., Gundel H., Sprenger T. et al. Patients with pain disorder show gray-matter loss in pain-processing structure: a voxel-based morphometric study. *Psychosom. Med.* 2009; 71: 49–56.
105. Schmidt-Wilcke T., Ganssbauer S., Neuner T. et al. Subtle grey matter changes between migraine patients and healthy controls. *Cephalgia.* 2008; 28: 1–4.
106. Kim J.H., Suh S.I., Seol H.Y., Oh K. Regional gray matter changes in patients with migraine: a voxel-based morphometry study. *Cephalgia* 2008; 28: 598–604.
107. Rocca M.A., Ceccarelli A., Falini A. et al. Brain gray matter changes in migraine patients with T2-visible lesions: a 3-T MRI study. *Stroke.* 2006; 37: 1765–1770.
108. Valfre W., Rainero I., Berguei M., Pinessi L. Voxel-based morphometry reveals gray matter abnormalities in migraine. *Headache.* 2008; 48: 109–17.
109. Schmidt-Wilcke T., Leinisch E., Straube A. et al. Gray matter decrease in patients with chronic tension type headache. *Neurology.* 2005; 65: 1483–1486.
110. Schmidt-Wilke T., Hierlmeier S., Leinisch E. Altered regional brain morphology in patients with chronic facial pain. *Headache.* 2010; 50: 1278–85.
111. Apkarian A.V., Sosa Y., Sonty S., Levy R.M. Chronic back pain is associated with decreased prefrontal and thalamic gray matter density. *J. Neurosci.* 2004; 24: 10410–5.
112. Mutso A.A., Radzicki D., Baliki M.N. et al. Abnormalities in hippocampal functioning with persistent pain. *J. Neurosci.* 2012; 32: 5747–56.
113. Schmidt-Wilke T., Leinisch E., Ganssbauer S. et al. Affective components and intensity of pain correlate with structural differences in gray matter in chronic back pain patients. *Pain.* 2006; 125: 89–97.
114. Geha P.Y., Baliki M.N., Harden R.N. et al. The brain in chronic CRPS pain: abnormal gray-white matter interactions in emotional and autonomic regions. *Neuron.* 2008; 60: 570–81.
115. Custin S.M., Peck C.C., Wilcox S.I. et al. Different pain, different brain: thalamic anatomy in neuropathic and non-neuropathic chronic pain syndromes. *J. Neurosci.* 2011; 31: 5956–64.
116. Custin S.M., Peck C.C., Cheney L.B. et al. Pain and plasticity: is chronic pain always associated with somatosensory cortex activity and reorganisation? *J. Neurosci.* 2012; 32: 14874–84.
117. Kuchinad A., Schweinhardt P., Seminowicz D.A., Wood P.B. Acceleration brain gray matter loss in fibromyalgia patients: premature aging of the brain? *J. Neurosci.* 2007; 27: 4004–7.
118. Lutz J., Jager L., de Quervain D. et al. White and gray matter abnormalities in the brain patients with fibromyalgia: a diffusion-tensor and volumetric imaging study. *Arthritis Rheum.* 2008; 58: 3960–9.
119. Burgner M., Gaubitz M., Konrad C. et al. Decreased gray matter volumes in the cingulo-frontal cortex and the amygdala in patients with fibromyalgia. *Psychosom. Med.* 2009; 71: 566–73.
120. Wood P.B., Glabus M.F., Simpson R., Paterson J.C. Changes in gray matter density in fibromyalgia: correlation with dopamine metabolism. *J. Pain.* 2009; 10: 609–18.
121. Moayed M., Weissman-Fogel I., Crawley A.P. et al. Contribution of chronic pain and neuroticism to abnormal forebrain gray matter in patients with temporomandibular disorder. *Neuroimage.* 2011; 55: 277–86.
122. Younger J.W., Shen Y.F., Goddard G., Mackey S.C. Chronic myofascial temporomandibular pain is associated with neural abnormalities in the trigeminal and limbic systems. *Pain.* 2010; 149: 222–8.
123. Gerstner G., Ichesco E., Quintero A., Schmidt-Wilcke T. Changes in regional gray and white matter volume in patients with myofascial-type temporomandibular disorders: voxel-based morphometry study. *J. Orofac. Pain.* 2011; 25: 99–106.
124. Gwilym S.E., Filippini N., Douaud G., Carr A.J., Tracey I. Thalamic atrophy associated with painful osteoarthritis of

the hip is reversible after arthroplasty: a longitudinal voxel-based morphometric study. *Arthritis Rheum.* 2010; 62: 2930-40.

125. Rodrigues-Raecke R., Niemeier A., Ihle K. et al. Brain gray matter decrease in chronic pain is the consequence and not the cause of pain. *J. Neurosci.* 2009; 29: 13746-50.

126. Blankstein U., Chen J., Diamant N.E., Davis K.D. Altered brain structure in irritable bowel syndrome: potential contributions of pre-existing and disease-driven factors. *Gastroenterology.* 2010; 138: 1783 — 9.

127. Davis K.D., Pope G., Chen J., Kwan C.L., Crawley A.P., Diamant N.E. Cortical thinning in IBS: implications for homeostatic, attention, and pain processing. *Neurology.* 2008; 70: 153 — 4.

128. Seminowicz D.A., Labus J.S., Bueller J.A., Tillsch K., Naliboff B.D., Bushnell M.C., Mayer E.A. Regional gray matter density changes in brains of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 2010; 139: 48 — 57.

129. Frokjaer J.B., Olesen S.S., Gram M. Altered brain microstructure assessed by diffusion tensor imaging in patients with chronic pancreatitis. *Gut.* 2011; 60: 1554 — 1562.

130. Tertulino F.F., Goldman S.M., Ardengh J.C. et al. Differentiation of acute and chronic pancreatitis by diffusion-weighted magnetic resonance imaging (DW-MRI): a prospective study. *Gastroenterology.* 2012; 142: (S242-242).

131. Farmer M.A., Chanda M.L., Parks E.L., Baliki M.N., Apkarian A.V. Brain functional and anatomical changes in chronic prostatitis /chronic pelvic pain syndrome. *J. Urol.* 2011; 186: 117 — 124.

132. Mordasini L., Weisstanner C., Rummel C. et al. Chronic pelvic pain syndrome in men is associated with reduction of relative gray matter volume in the anterior cingulate cortex compared to healthy controls. *J. Urol.* 2012; 188: 2233-7.

133. As-Sanie S., Harris R.E., Napadow V., Kim J., Neshewat G. Changes in regional gray matter volume in women with chronic pelvic pain: a voxel-based morphometry study. *Pain.* 2012; 153: 1006 -14.

134. Schweinhardt P., Kuchinad A., Pukall C.F., Bushnell M.C. Increased gray matter density in young women with chronic vulvar pain. *Pain.* 2008; 140: 411-9.

135. Tu C.H., Niddam D.V., Chao H.T. et al. Brain morphological changes associated with cyclic menstrual pain. *Pain.* 2010; 150: 462 — 8.

136. Agostini A., Benuzzi F., Filippini N., Bertani A. New insights into the brain involvement in patients with

Crohn`s disease: voxel-based morphometry study. *Neurogastroenterol. Motil.* 2012; 25: 147 — 82.

137. Davis K.D., Moayed M. Central mechanisms of pain revealed through functional and structural MRI. *J. neuro-immune Pharmacol.* 2013; 8: 518 — 534.

138. Henderson L.A., Peck C.C., Peterson E.T. et al. Chronic pain: lost inhibition? *J. Neurosci.* 2013; 33: 7574 — 82.

139. Kukushkin M.L., Igonkina S.I. Value GAMK in the pathogenesis of pain syndromes. *Patologicheskaya fiziologia i eksperimentalnaya terapiya.* 2014; 1: 68-78. (in Russian)

140. Labus J.S., Dinov I.D., Jiang Z. et al. Irritable bowel syndrome in female patients is associated with alterations in structural brain networks. *Pain.* 2014; 155: 137 — 49.

141. Teepker M., Menzler K., Belke M. et al. Diffusion tensor imaging in episodic cluster headache. *Headache.* 2012; 52: 274 — 82.

142. Chen J.Y., Blankstein U., Diamant N.F., Davis K.D. White matter abnormalities in irritable bowel syndrome and relation to individual factors. *Brain Res.* 2011; 1392: 121 — 31.

143. Moayed M., Weissman-Fogel L., Salomons T.V. et al. White matter brain and trigeminal nerve abnormalities in temporomandibular disorder. *Pain.* 2012; 153: 1467 — 1477.

144. Basbaum A.J., Fields H.L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathway and endorphin circuitry. *Annu. Rev. Neurosci.* 1984; 7: 309 — 38.

145. Beits A.J. The sites of origin brain stem neurotensin and serotonin projections to the rodent nucleus raphe magnus. *Pain.* 1992; 2: 829-842.

146. Spetea M., Rydelis G., Nylander I. et al. Alteration in endogenous opioid systems due to chronic inflammatory pain conditions. *Eur. J. Pharmacol.* 2002; 435: 245 — 52.

147. Krizhanovsky G.N., Grafova V.N., Karganov M.U. Analgesic effect of peptide factors in the spinal cord of rats in the formation and development of generator pathologically enhanced excitation. *Bulleten eksperimentalnoi biologii i medicini.* 1994; №10. 374-377. (in Russian)

148. Jones A.K.P., Cunningham V.J., Ha K.S. et al. Changes in central opioid receptor binding in relation to inflammation and pain patients with rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.* 1994; 33: 909 — 16.

Поступила 29.10.14  
Received 29.10.14

#### Сведения об авторах:

Кукушкин Михаил Львович — д.м.н., проф., зав. лаб. клинической патофизиологии боли ФГБНУ «НИИ ОПП», e-mail mkuk57@gmail.com

Гурко Наталья Сергеевна — к.б.н. редактор I категории редакционно-издательской группы научно-организационного отдела ФГБНУ «НИИ ОПП», e-mail ngourko@mail.ru

Иванов В.В., Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Носарева О.Л., Федорова Т.С., Новицкий В.В.

## **Молекулярные механизмы модуляции липолиза в жировой ткани и развитие инсулинорезистентности при сахарном диабете**

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 634050, Томск, ул. Московский тракт, 2

*Представлен анализ современных данных литературы и результатов собственных исследований о развитии окислительного стресса в жировой ткани при сахарном диабете. Обсуждаются механизмы модуляции спонтанного и стимулированного липолиза в адипоцитах в условиях окислительного стресса. Рассматривается участие жировой ткани в формировании инсулинорезистентности при сахарном диабете первого и второго типов.*

**Ключевые слова:** сахарный диабет; адипоциты; окислительный стресс; окислительная модификация белков; перекисное окисление липидов; аллоксан

Ivanov V.V., Shakhristova E.V., Stepovaya E.A., Nosareva O.L., Fedorova T.S., Novitsky

## **Molecular mechanisms of modulation of lipolysis in adipose tissue and development of insulinresistance in diabetes**

Siberian state medical university, 2, Moscovski Trakt, Tomk, 634050, Russia

*Analysis of modern literature data as well as the results of personal research on development of oxidative stress in adipose tissue in diabetes is presented. Mechanisms of modulation of spontaneous and induced lipolysis in adipocytes in conditions of oxidative stress are discussed. Participation of adipose tissue in forming insulin resistance in types 1 and 2 diabetes is considered.*

**Key words:** diabetes mellitus; adipocyte; oxidative stress; oxidative modification of proteins; lipid peroxidation; alloxan

Сахарный диабет (СД) по медико-социальной значимости занимает третье место после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. В России в 2010 г. насчитывалось 3,2 млн больных СД 1 и 2 типов. К 2030 г. число зарегистрированных больных СД возрастет до 5,8 млн чел. [1]. Диабет является главной причиной слепоты, значительно усиливает опасность развития инфаркта миокарда, ишемической болезни сердца, нефропатий, гипертонии [2—5].

СД характеризуется изменениями обмена в организме всех основных энергетических субстратов и сопровождается первичными или вторичными нарушениями секреции гормонов: инсулина, глюкагона, гормона роста, и чувствительности к ним.

Особое значение при СД 1 типа имеют нарушения липидного обмена. Известно, что инсулин ингибирует активность гормончувствительной липазы путем её дефосфорилирования протеинкиназой А при участии

фосфодиэстеразы 3В. Дефицит инсулина и гипергликемия при СД 1 типа приводят к повышению экспрессии гормончувствительной липазы. Таким образом, в результате снижения ингибирующего влияния инсулина на гормончувствительную липазу в жировой ткани происходит значительная активация липолиза. Кроме того, снижение утилизации глюкозы приводит к уменьшению содержания глицерол-3-фосфата, необходимого для реэтерификации жирных кислот в самой жировой клетке [6, 7]. При СД 2 типа главным фактором патогенеза является инсулинорезистентность [8, 9]. В последнее время появились данные о том, что и при СД 1 типа развивается инсулинорезистентность. При СД 2 типа нарушается чувствительность к инсулину клеток печени, мышц, жировой ткани, а бета-клеток островков Лангерганса к глюкозе. В большинстве случаев инсулинорезистентность развивается задолго до возникновения гипергликемии [8]. Инсулинорезистентность скелетных мышц и клеток печени приводит к снижению поглощения глюкозы миоцитами и активации глюконеогенеза и гликогенолиза в гепатоцитах, что способствует развитию ги-

**Для корреспонденции:** Шахристова Евгения Викторовна, к.м.н., руководитель научно-образовательного центра молекулярной медицины ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России; shaxristova@yandex.ru

пергликемии [8]. Инсулинорезистентность жировой ткани сопровождается активацией липолиза и хроническим повышением уровня свободных жирных кислот (СЖК) в плазме крови, оказывающих токсическое действие на бета-клетки островков Лангерганса, приводя к их гибели [10, 11]. Сохранившиеся бета-клетки поджелудочной железы компенсаторно увеличивают секрецию инсулина, что приводит к развитию гиперинсулинемии. При декомпенсации СД высокий уровень глюкозы в крови повреждает бета-клетки островков Лангерганса, что приводит к прогрессивному снижению их количества и возникновению стойкой гипергликемии [12, 13].

Долгое время адипоциты рассматривались как энергетическое депо. Однако в последние годы жировая ткань признана активным эндокринным и паракринным органом, играющим важную роль в регуляции энергетического гомеостаза, чувствительности к инсулину, метаболизма глюкозы и липидов через секрецию протеинов и гормонов. Адипоциты секретируют гормоны и цитокины как с центральным действием на регуляцию энергетического обмена (например, лептин), так и периферическим влиянием на чувствительность к инсулину или инсулинорезистентность (например, резистин, адипонектин и белок, стимулирующий адипирование). Кроме того, адипоциты, реагируя на поступающие нейроэндокринные сигналы, участвуют в липогенезе, липолизе и термогенезе [14, 15].

Эндокринная функция адипоцитов реализуется через продукцию компонентов ренин-ангиотензиновой системы (ангиотензиноген, ренин, ангиотензинпревращающий фермент) и гормона лептина. Наряду с этими белками адипоцит экспрессирует выработку катепсинов G и D, осуществляющих альтернативный путь образования ангиотензина II, не требующий присутствия ренина. Хотя жировая ткань не единственный источник секреции данных факторов, вклад адипоцитов в плазматический уровень ингибитора активатора плазминогена первого типа (РАI-1) и ангиотензина II становится более значимым при ожирении, что может способствовать развитию тромбоза, тромбоемболии и гипертонии. СД 2 типа является серьезным фактором риска развития атеросклероза [16, 17, 18].

Гормон лептин активно секретируется адипоцитами при избытке пищи и регулирует пищевое поведение. Жировая ткань также секретирует важные регуляторы метаболизма липопротеинов, такие, как липопротеинлипаза, аполипопротеин E, белок, переносящий эфиры холестерина [17].

В адипоцитах экспрессируются рецепторы ряда цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-6), факторов роста, рецепторы гормонов: тиротропина, ангиотензина II, глюкоаго-

на, инсулина, лептина, гормона роста, а также  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторы. Благодаря этому интенсивность синтеза триацилглицеролов и секреция лептина адипоцитами регулируется как метаболическими сигналами (поступлением глюкозы либо жирных кислот), так и гуморальными влияниями. Глюкокортикоиды стимулируют экспрессию гена стеариол-КоА-десатуразы, участвующей в синтезе ненасыщенных жирных кислот, гена Ob, кодирующего гормон лептин, и гена ангиотензиногена, предшественника ангиотензина II. Инсулин стимулирует экспрессию генов синтазы жирных кислот, осуществляющей биосинтез насыщенных жирных кислот. В то же время, кроме влияния на экспрессию генов, инсулин также активирует транслокацию глюкозного транспортера (GLUT) из цитоплазмы в клеточную мембрану, вследствие чего активизируется поступление глюкозы [14, 17, 18].

Таким образом, секретлируемые жировой тканью адипокины оказывая воздействие ауто/паракринным способом, регулируют пролиферацию, дифференцировку и метаболизм клеток самой жировой ткани, а поступая в общую циркуляцию, адипокины действуют как сигнальные молекулы, оказывая влияние на функцию различных органов и систем организма.

В механизмах возникновения СД 1 и 2 типов и развития их осложнений важную роль играет окислительный стресс [19, 20, 21]. Источниками активных форм кислорода (АФК) в клетках являются реакции гликозилирования белков, дыхательная цепь митохондрий, мембраносвязанная НАДФН-оксидаза и другие ферменты [20]. Главным источником АФК в клетках является дыхательная цепь митохондрий, продуцирующая супероксидный анион-радикал в первом и третьем комплексе при участии убихинона [22]. Гипергликемия и высокий уровень СЖК при СД также способствуют гиперпродукции АФК в дыхательной цепи, приводящей к окислительной модификации макромолекул в клетке [20]. Наряду с этим, активные свободные радикалы образуются при аутоокислении глюкозы и ее метаболических интермедиатов — 3-фосфоглицерата, глюкозо-6-фосфата и фруктозо-6-фосфата [23, 24]. Это приводит к образованию реактивных дикарбонильных сахаров — метилглиоксаля и 3-дезоксиглюкозона, запускающих процесс неферментативного или аутоокислительного гликозилирования белков с генерацией АФК [25].

Аллоксан, широко применяемый для моделирования СД 1 типа, поглощается избирательно бета-клетками поджелудочной железы и осуществляет свое диабетогенное действие, способствуя генерации АФК [26, 27]. Другие органы и ткани также подвергаются воздействию аллоксана, но они более резистентны к действию АФК, что приводит к менее выраженному токсическому эффекту [28].



При окислении аллоксана в клетке образуется диалуровая кислота, которая вступает в редокс-цикл, в результате чего генерируется  $O_2^{\bullet-}$  супероксидный анион-радикал (рис. 1). Реакция между аллоксаном и диалуровой кислотой приводит к образованию промежуточного радикала аллоксана ( $HA^{\bullet}$ ) [26, 27], который восстанавливается глутатионом.  $O_2^{\bullet-}$  вызывает высвобождение  $Fe^{3+}$  из ферритина и способствует восстановлению его в  $Fe^{2+}$  [27]. К тому же сам  $HA^{\bullet}$  может восстанавливать  $Fe^{3+}$  до  $Fe^{2+}$  (рис. 1).  $O_2^{\bullet-}$  способен дисмутировать до пероксида водорода спонтанно или под действием супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1.). В присутствии  $Fe^{2+}$  и пероксида водорода в реакции Фентона образуется высокоактивный  $OH^{\bullet-}$ , наличие которого было показано в модельных экспериментах и в клетках островков Лангерганса при инкубации их с аллоксаном [29].

Использование аллоксана как прооксиданта позволило нам изучить модуляцию липолиза в условиях окислительного стресса при СД 1 типа [30, 31, 32]. Повышенная продукция АФК на фоне снижения антиоксидантной защиты в клетках при СД приводит к повреждению макромолекул и может сопровождаться окислительной модификацией липидов, белков и нуклеиновых кислот, что лежит в основе патогенеза СД и развития осложнений [2, 4, 21, 31, 33].

В адипоцитах содержится высокая концентрация субстратов, подверженных свободнорадикальному окислению (рис. 2) [34, 35]. Известно, что при ожирении и СД 2 типа в жировой ткани активируется свободнорадикальное окисление, в том числе перекисное окисление липидов (ПОЛ) [5, 36]. В то же время состояние свободнорадикального окисления липидов и антиокислительного потенциала в адипоцитах при СД 1 типа не исследовано. Нами установлено, что при аллоксановом диабете в адипоцитах крыс происходит активация процессов ПОЛ, приводящих

к окислению ненасыщенных жирных кислот, и снижение редокс-потенциала системы глутатиона [36].

Увеличение содержания продуктов окислительной модификации белков в адипоцитах крыс с аллоксановым диабетом может играть важную роль в нарушении метаболизма липидов и его регуляции в жировой ткани при аллоксановом диабете [36]. Было показано, что жировая ткань очень чувствительна к свободнорадикальному окислению [37, 38], и значительное увеличение ее массы при ожирении может способствовать развитию окислительного стресса во всем организме [5]. Q.G. Zhou и соавторы (2010) показали, что продукты окислительной модификации альбумина приводят к активации НАДФН-оксидазы, повышению продукции АФК, снижению стимулированного инсулином транспорта глюкозы, нарушению трансдукции инсулинового сигнала и развитию инсулинорезистентности в адипоцитах [39]. Образование карбонильных производных белков в адипоцитах может быть следствием низкой активности глутатионтрансферазы, участвующей в нейтрализации образующихся в процессах свободнорадикального окисления липидов альдегидов. Низкая активность этого фермента также является одной из причин развития инсулинорезистентности в жировой ткани [35, 40].

В условиях окислительного стресса и неконтролируемой генерации АФК преобладающими становятся процессы окислительной модификации белков, приводящие в конечном счете к утрате их биологической активности (ферментативной, рецепторной, транспортной и т.д.). Окислительная модификация белков приводит к появлению новых антигенов и провоцирует иммунный или аутоиммунный ответ, что играет важную роль в патогенезе и развитии осложнений при СД 1 типа [2, 41].

В адипоцитах триацилглицеролы (ТАГ) находятся в виде жировых капель, в которых протекают про-

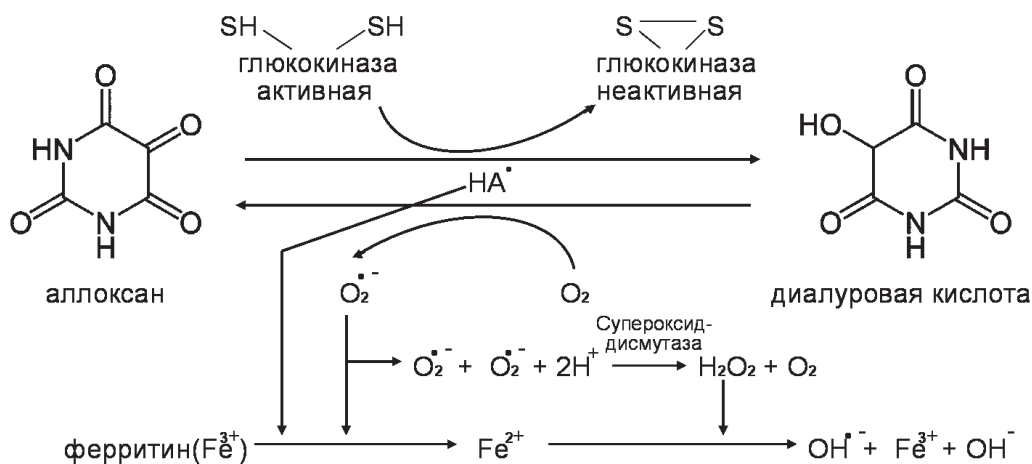


Рис. 1. Механизм продукции активных форм кислорода В-клетками поджелудочной железы крыс под действием аллоксана [27].

цессы липогенеза и липолиза. Липолиз в жировой ткани является катаболическим процессом, приводящим к распаду ТАГ в адипоцитах до глицерола и СЖК. Открытие белков, вовлеченных в регуляцию гидролиза ТАГ, различных эндокринных и паракринных факторов привели к пересмотру некоторых механизмов путей трансдукции сигнала в жировых клетках [42]. Для липолиза необходимо, чтобы свободные цитозольные липазы могли получить доступ к гидрофобным ТАГ, окруженным белками (перилипинами А и В, адипофилином, липотрансином и др.), покрывающими липидную каплю. Глицерол и гидрофобные СЖК, образующиеся при липолизе, должны быть элиминированы из жировой клетки с помощью белка переносчика для жирных кислот и аквапорина 7 для удаления глицерола [43]. При стимуляции липолитическими гормонами перилипин фосфорилируется протеинкиназой А (ПКА) по остаткам серина. Фосфорилирование серина в положении 492 приводит к изменению поверхности жировой капли таким образом, что увеличивается площадь капли, доступная для закрепления липазы [44].

Генетически обусловленное отсутствие перилипина А способствует увеличению спонтанного и ингибированию стимулированного катехоламинами липолиза,

развитию инсулинорезистентности, что приводит к повышенному риску развития ожирения, активации окислительных процессов и нарушению биосинтеза липидов в жировой ткани, печени, скелетной мускулатуре, почках и других органах и тканях [45].

Главная роль активаторов липолиза принадлежит катехоламинам, действующим через  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -,  $\beta_3$ -рецепторы на поверхности клеток.  $\beta_1$ - и  $\beta_2$ -рецепторы широко распространены в различных тканях организма,  $\beta_3$ -рецепторы были обнаружены только в клетках жировой ткани. Их стимуляция приводит к увеличению липолиза в адипоцитах людей и животных [46].  $\beta$ -рецепторы ассоциированы с Gs белком, их активация приводит к диссоциации G белка, отсоединению комплекса  $\alpha$ -субъединица-ГТФ, который активирует аденилатциклазу, синтезирующую цАМФ из АТФ. В свою очередь, цАМФ активирует цАМФ-зависимую ПКА, фосфорилирующую гормончувствительную липазу и перилипин А на поверхности эндогенных липидных капель, запуская гидролиз ТАГ [47].

В нашей лаборатории было показано, что активация окислительного стресса в адипоцитах крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом приводит к стимуляции спонтанного и ингибированию стимулированного агонистом  $\beta_2$ -адренорецепторов липолиза

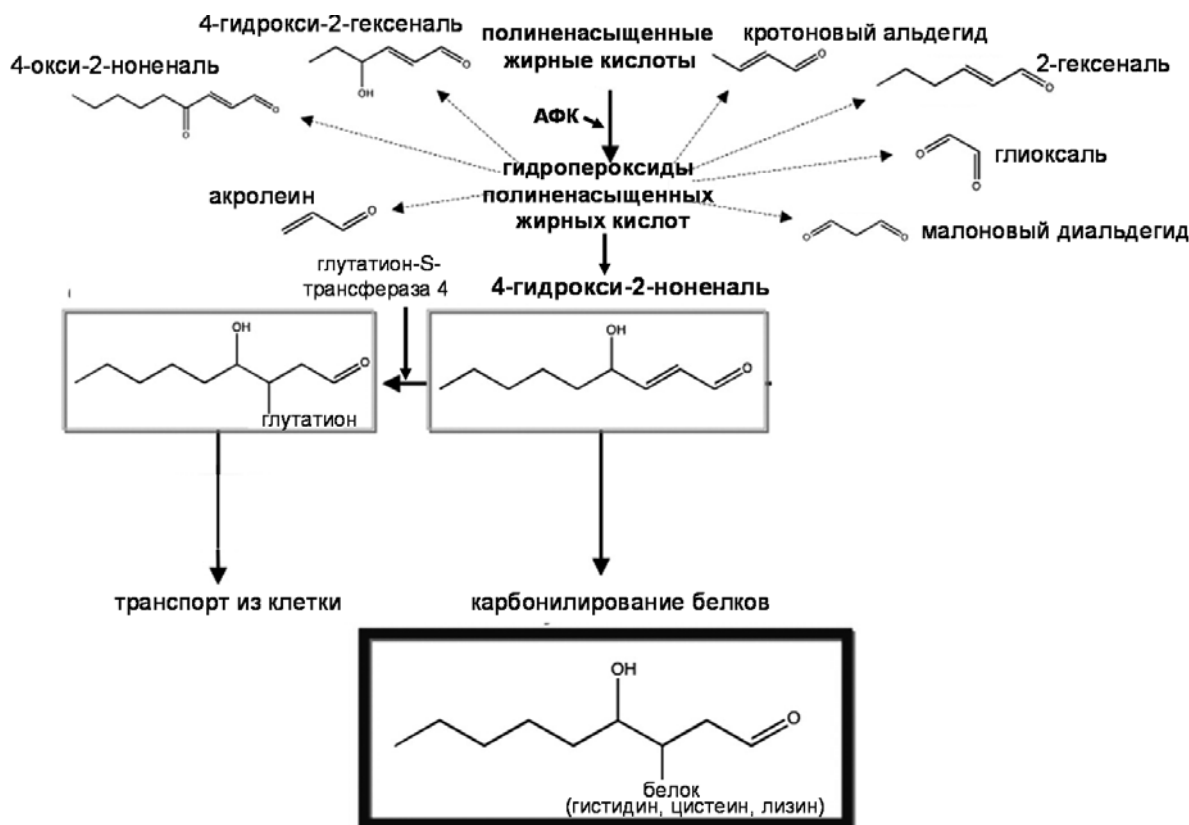


Рис. 2. Образование продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных производных белков при окислительном стрессе [35].

[48]. Механизмы регуляции липолиза в жировых клетках в настоящее время интенсивно изучаются. Гормончувствительная липаза и перилипин — основные факторы в адипоцитах, которые регулируют липолиз [49]. В нестимулируемых эффекторами клетках гормончувствительная липаза диффузно распределена в цитозоле, в то время как перилипин покрывает поверхность липидных капель. Это препятствует гидролизу молекул ТАГ гормончувствительной липазой [50]. При стимуляции гормонами повышается концентрация внутриклеточного цАМФ и активируется ПКА, которая фосфорилирует гормончувствительную липазу и облегчает ее транслокацию на поверхности жировых капель [50, 51]. Одновременно ПКА фосфорилирует перилипин, что изменяет поверхностную структуру жировых капель и облегчает связывание гормончувствительной липазы. Два одновременно происходящих события — фосфорилирование гормончувствительной липазы и белка перилипина — приводят к активации липолиза [51].

В исследованиях Т. Tsujita с соавторами (2006) было показано, что активность гормончувствительной липазы проявляется даже в отсутствии липолитических гормонов, при этом её действие ограничивается фосфа-

тидилхолином на поверхности эндогенных липидных капель в адипоцитах [52]. Можно предполагать, что активация ПОЛ приводит к дезинтеграции фосфолипидного монослоя на поверхности жировой капли. Это повышает доступность ТАГ для действия липазы и вызывает активацию спонтанного липолиза.

Одним из механизмов ингибирующего действия окислительного стресса на активированный через  $\beta$ -адренорецепторы липолиз может быть изменение концентрации цАМФ в ответ на стимуляцию агонистом. Снижение содержания цАМФ, возможно, связано с уменьшением образования АТФ — в условиях окислительного стресса. Наряду с этим АТФ служит источником энергии, необходимой для перемещения гормончувствительной липазы на поверхности жировой капли [53], что может быть еще одной причиной ингибирования стимулированного липолиза на этапах трансдукции гормонального сигнала после аденилатциклазы. Показано, что источником АТФ, используемого для синтеза цАМФ, является, главным образом, гликолиз, в то время как для транслокации гормончувствительной липазы — окислительное фосфорилирование [50].

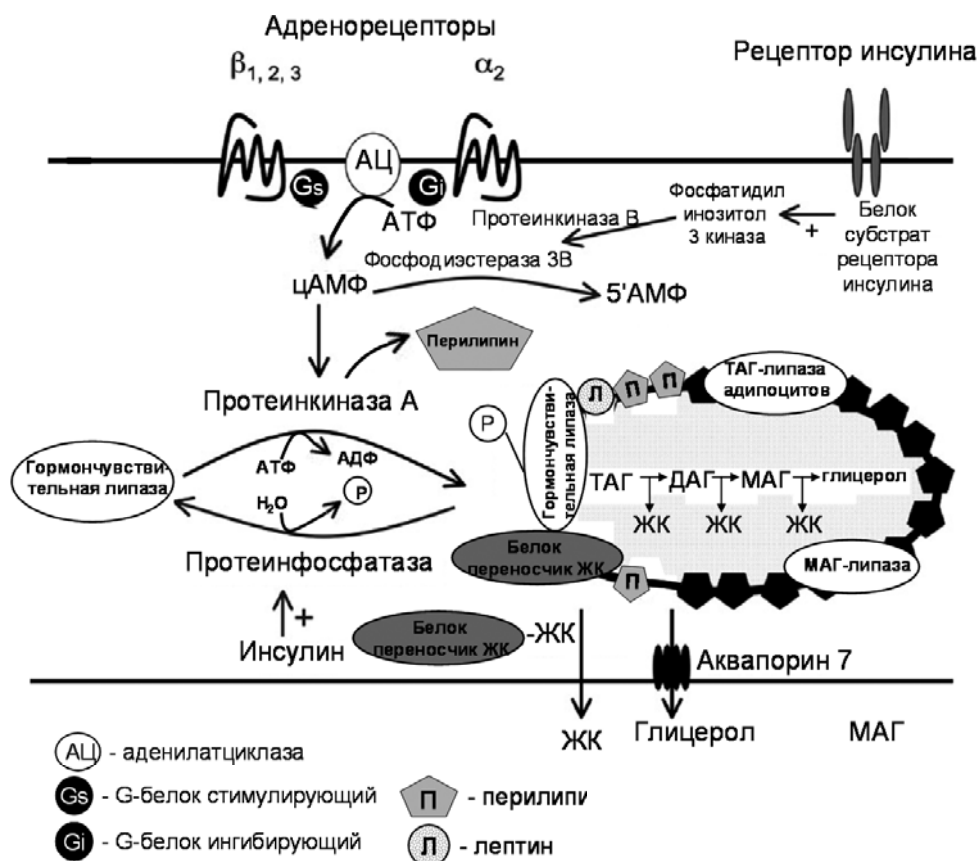


Рис. 3. Механизм активации липолиза в адипоцитах [50].

Катехоламины могут оказывать и антилиполитический эффект, действуя через  $\alpha_2$ -адренорецепторы, ассоциированные с С1 белком. При активации этих рецепторов происходит ингибирование аденилатциклазы комплексом  $\alpha$  субъединица-ГТФ, как следствие, снижение уровня внутриклеточного цАМФ и интенсивности липолиза (рис. 3). От соотношения  $\beta$ - и  $\alpha$ -рецепторов к катехоламинам в жировой клетке зависит активность липолиза [50].

Основное антилиполитическое действие в организме определяется инсулином и инсулиноподобным фактором роста, действующих через рецепторы, ассоциированные с тирозинкиназой. Взаимодействие инсулина с рецептором приводит к аутофосфорилированию тирозинкиназы, что запускает каскад реакций, активирующий фосфодиэстеразу, снижающую уровень внутриклеточного цАМФ [54].

Интенсивный липолиз в адипоцитах приводит к выделению большого количества СЖК, которые транспортируются преимущественно в печень и препятствуют связыванию инсулина с гепатоцитами, обуславливая развитие инсулинорезистентности на уровне печени. Инсулин, не связавшийся с гепатоцитами, способствует развитию системной гиперинсулинемии. При нарушенной ауторегуляции инсулиновых рецепторов, гиперинсулинемия усиливает инсулинорезистентность периферических органов. СЖК подавляют также тормозящее действие инсулина на глюконеогенез, способствуя увеличению продукции глюкозы печенью. Попадая в системный кровоток, СЖК способствуют нарушению поглощения глюкозы и ее утилизации в мышечной ткани в цикле глицерол/СЖК и, таким образом, усилению периферической инсулинорезистентности. Наряду с этим СЖК оказывают прямое токсическое воздействие на бета-клетки поджелудочной железы, приводя к снижению их секреторной активности [55].

Таким образом, повышение активности свободнорадикального окисления при СД способствует модуляции липолиза в жировой ткани. Увеличение активности спонтанного липолиза и ингибирование антилиполитического действия инсулина в жировых клетках в условиях окислительного стресса, может являться одной из причин повышенного содержания свободных жирных кислот в плазме крови при СД 1 типа, что в конечном итоге может приводить к развитию инсулинорезистентности.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для ведущих научных школ (договор №4184.2014.7-НШ).*

## Список литературы

1. Сунцов Ю.И., Болотская Л.Л., Маслова О.В., Казаков И.В. Эпидемиология сахарного диабета и прогноз его распространенности в российской федерации. *Сахарный диабет*. 2011; 1: 15-8.
2. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты. СПб.: Медицинская пресса; 2006. 400 с.
3. Луцак В.И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма. *Биохимия*. 2007; 72(8): 995-1015.
4. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА; 2008. 284с.
5. Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Clin. Invest.* 2004; 114(12): 1752-61.
6. Kraemer F.B., Shen W.J. Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-) acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J Lipid Res.* 2002; 43(10): 1585-94.
7. Singhal J., Nagaprashantha L., Vatsyayan R., Awasthi S., Singhal S.S. RLLP76, a glutathione-conjugate transporter, plays a major role in the pathogenesis of metabolic syndrome. *PLoS One.* 2011; 6(9): 24688-99.
8. Rains J.L., Jain S.K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* 2011; 50(5): 567-75.
9. Chang Y.C., Chuang L.M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: from molecular mechanism to clinical implication. *Am. J. Transl. Res.* 2010; 2(3): 316-31.
10. Newsholme P., Haber E.P., Hirabara S.M., Rebelato E.L., Procopio J., Morgan D. et al. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J. Physiol.* 2007; 583(1): 9-24.
11. Клебанова Е.М., Балаболкин М.И., Кремниевская В.М. Значение жировой ткани и ее гормонов в механизмах инсулиновой резистентности и развития сахарного диабета 2-го типа. *Клиническая медицина*. 2007; 85(7): 20-7.
12. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Кремниевская В.М. Возможна ли патогенетическая терапия сахарного диабета 2-го типа. *Проблемы эндокринологии*. 2008; 54(5): 50-6.
13. Campbell R.K. Fate of the beta-cell in the pathophysiology of type 2 diabetes. *J. Am. Pharm. Assoc.* 2009; 49(1): S.10-5.
14. Колчанов Н.А., Воевода М.И., Кузнецова Т.Н., Мордвинов В.А., Игнатъева Е.В. Генные сети липидного метаболизма. *Бюллетень СО РАМН*. 2006; 120(2): 29-42.
15. Yu Yi-H., Ginsberg H.N. Adipocyte signaling and lipid homeostasis. *Circulation Research*. 2005; 96: 1042-52.
16. Gale S.M., Gastracane V.D., Mantzoros C.S. energy homeostasis, obesity and eating disorders: recent advances in endocrinology. *J. Nutr.* 2004; 134(2): 295-98.
17. Jequier F. Leptin signaling, adiposity and energy balance. *Ann. NY Acad. Sci.* 2002; 967(6778): 379-88.
18. Frubeck G., Gomez-Ambrosi J., Muruzabal F.J., Burrell M.A. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2001; 280(6): E827-47.
19. Иванов В.В., Луста И.В., Сатрихина Т.Н. Удинцев Н.А. Гипоинсулинемия и перекисное окисление ли-

- пидов при эмоционально-болевым стрессе. *Проблемы эндокринологии*. 1990; 36(2): 77-80.
20. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005; 54: 1615-25.
21. Giacco F., Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* 2010; 107(9): 1058-70.
22. Дубинина Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса. *Вопросы медицинской химии*. 2001; 47(1): 561-81.
23. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Креминская В.М. Применение убихинона (коэнзима Q) в терапии сахарного диабета и его сосудистых осложнений. *Сахарный диабет*. 2007; 4: 37-42.
24. Ahmed N., Thornalley P.J. Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications? *Diabetes. Obes. Metab.* 2007; 9: 233-45.
25. Peyroux J., Sternberg M. Advanced glycation endproducts (AGEs): pharmacological inhibition in diabetes. *Pathol. Biol.* 2006; 54: 405-19.
26. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008; 51(2) 216-26.
27. Szkudelski T. The mechanism of alloxan end streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 2001; 50: 536-46.
28. Иванов В.В., Васенёва И.В., Удинцев Н.А. Перекисное окисление липидов в печени крыс при аллоксановом диабете. *Проблемы эндокринологии*. 1984; 30(1): 70-3.
29. Grankvist K. Alloxan-induced luminol luminescence as a tool for investigating mechanisms of radical-mediated diabetogenicity. *Biochem.* 1981; 200: 685-90.
30. Иванов В.В., Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Жаворонок Т.В., Новицкий В.В. Влияние аллоксана на спонтанный липолиз и систему глутатиона в изолированных адипоцитах крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2011; 151(3): 288-91.
31. Иванов В.В., Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Жаворонок Т.В., Новицкий В.В. Влияние аллоксана на систему глутатиона и окислительную модификацию белков в адипоцитах при экспериментальном диабете. *Бюллетень сибирской медицины*. 2011; 10(3): 44-7.
32. Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Иванов В.В., Носарева О.Л., Дзюман А.Н., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. Свободнорадикальное окисление белков и липидов в адипоцитах в условиях окислительного стресса. *Молекулярная медицина*. 2014; 1: 59-64.
33. Liu Q., Sun L., Tan Y., Wang G., Lin X., Cai L. Role of iron deficiency and overload in the pathogenesis of diabetes and diabetic complications. *Curr. Med. Chem.* 2009; 16(1): 113-29.
34. Festa M., Ricciardelli G., Mele G., Pietropaolo C., Ruffo A., Colonna A. Overexpression of H ferritin and up-regulation of iron regulatory protein genes during differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes. *J Biol. Chem.* 2000; 275(47): 36708-12.
35. Иванов В.В., Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Жаворонок Т.В., Новицкий В.В. Перекисное окисление липидов и система глутатиона в жировой ткани крыс с аллоксановым диабетом. *Бюллетень СО РАМН*. 2010; 30(6): 101-4.
36. Pogliano S., Galvani S., Bour S., Andre M., Prunet-Marcassus B., Penicaud L. et al. Adipose tissue sensitivity to radiation exposure. *Am. J. Pathol.* 2009; 174(1): 44-53.
37. Galinier A., Carriere A., Fernandez Y., Carpenne C., Andre M., Caspar-Bauguil S. et al. Adipose tissue pro-adipogenic redox changes in obesity. *Biol. Chem.* 2006; 281: 12682-87.
38. Zhou Q.G., Peng X., Hu L.L., Xie D., Zhou M., Hou F.F. Advanced oxidation protein products inhibit differentiation and activate inflammation in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Cell Physiol.* 2010; 225(1): 42-51.
39. Grimsrud P.A., Picklo M.J., Griffin T.J., Bernlohr D.A. Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance: identification of adipocyte fatty acid-binding protein as a cellular target of 4-hydroxynonenal. *Mol. Cell. Proteomics.* 2007; 6(4): 624-37.
40. Curtis J.M., Grimsrud P.A., Wright W.S. Downregulation of adipose glutathione S-transferase A4 leads to increased protein carbonylation, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction. *Diabetes*. 2010; 59(5): 1132-42.
41. Wang G., Wang J., Ma H., Khan M.F. Increased nitration and carbonylation of proteins in MRL+/+ mice exposed to trichloroethene: potential role of protein oxidation in autoimmunity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009; 237(2): 188-95.
42. Bartness T.J., Song C.K. Thematic review series: adipocyte biology. Sympathetic and sensory innervation of white adipose tissue. *J. Lipid. Res.* 2007; 48(8): 1655-72.
43. Brasaemle D.L., Dolios G., Shapiro L. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 46835-42.
44. Garcia A., Subramanian V., Sekowski A., Bhattacharyya S., Love M.W., Brasaemle D.L. The amino and carboxyl termini of perilipin A facilitate the storage of triacylglycerols. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 8409-16.
45. Miyoshi H., Souza S.C., Endo M., Sawada T., Perfield J.W. 2nd, Shimizu C. et al. Perilipin overexpression in mice protects against diet-induced obesity. *J. Lipid Res.* 2010; 51(5): 975-82.
46. Robidoux J., Martin T.L., Collins S. Beta-adrenergic receptors and regulation of energy expenditure: a family affair. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2004; 44: 297-323.
47. Bastard J.P., Maachi M., Van Nhieu J.T., Jardel C., Bruckert E., Grimaldi A. et al. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87: 84-9.
48. Шахристова Е.В., Иванов В.В., Степовая Е.А., Новицкий В.В. Влияние супероксидного анион-радикала и глутатиона на липолиз в адипоцитах крыс при окислительном стрессе, индуцированном аллоксаном. *Вестник наук Сибири*. 2012; 4(5): 258-66. Available at: <http://sjs.tpu.ru/journal/article/view/458> (accessed 4 February 2014).
49. Jaworski K., Sarkadi-Nagy E., Duncan R.E., Ahmadian M., Sul H.S. Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 2007; 293: G1-4.
50. Jocken J.W., Blaak E.E. Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity. *Physiol. Behav.* 2008; 94(2) 219-30.
51. Sztalryd C., Xu G., Dorward H., Tansey J.T., Contreras J.A., Kimmel A.R. et al. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *Cell. Biol.* 2003; 160: 1093-103.
52. Tsujita T. Basal lipolysis in epididymal fat cells from streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2006; 52(1): 47-53.
53. Brasaemle D.L., Rubin B., Harten I.A., Gruia-Gray J., Kimmel A.R., Londos C. Perilipin a increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *Biol. Chem.* 2000; 275(49): 38486-93.
54. Choi Y.H., Park S., Hockman S., Zmuda-Trzebiatowska E., Svennelid F., Haluzik M. et al. Alterations in regulation of energy homeostasis in cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B-null mice. *J. Clin. Invest.* 2006; 116: 3240-51.

55. Graciano M.F., Valle M.M., Kowluru A., Curi R., Carpinelli A.R. Regulation of insulin secretion and reactive oxygen species production by free fatty acids in pancreatic islets. *Islets*. 2011; 3(5): 213-23.

## References

1. Suncov Ju.I., Bolotskaja L.L., Maslova O.V., Kazakov I.V. Epidemiology of diabetes mellitus and the forecast of its prevalence in the Russian Federation. *Diabetes Mellitus*. 2011; 1: 15-8. (in Russian)
2. Dubinina E.E. Products of metabolism of oxygen in the functional activity of cells (life and death, creation and destruction). Physiological and clinical-biochemical aspects. Saint-Petersburg: Medical press; 2006. 400 p. (in Russian)
3. Lushhak V.I. Free radical oxidation of proteins and its connection with the functional state of the body. *Biochemistry*. 2007; 72(8): 995-1015. (in Russian)
4. Menshchikova E.B., Zenkov N.K., Lankin V.Z., Bondar I.A., Trufakin V.A. Oxidative stress: Pathological conditions and diseases. Novosibirsk: ART; 2008. 284p. (in Russian)
5. Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Clin. Invest.* 2004; 114(12): 1752-61.
6. Kraemer F.B., Shen W.J. Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-) acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J Lipid Res.* 2002; 43(10): 1585-94.
7. Singhal J., Nagaprashantha L., Vatsyayan R., Awasthi S., Singhal S.S. RLIP76, a glutathione-conjugate transporter, plays a major role in the pathogenesis of metabolic syndrome. *PLoS One*. 2011; 6(9): 24688-99.
8. Rains J.L., Jain S.K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* 2011; 50(5): 567-75.
9. Chang Y.C., Chuang L.M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: from molecular mechanism to clinical implication. *Am. J. Transl. Res.* 2010; 2(3): 316-31.
10. Newsholme P., Haber E.P., Hirabara S.M., Rebelato E.L., Procopio J., Morgan D. et al. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J. Physiol.* 2007; 583(1): 9-24.
11. Klebanova E.M., Balabolkin M.I., Kreminskaja V.M. The value of adipose tissue and its hormones in the mechanisms of insulin resistance and diabetes of the 2nd type. *Clinical medicine*. 2007; 85(7): 20-7. (in Russian)
12. Balabolkin M.I., Klebanova E.M., Kreminskaja V.M. Is it possible pathogenetic therapy of diabetes mellitus of 2nd type. *Problems of Endocrinology*. 2008; 54(5): 50-6. (in Russian)
13. Campbell R.K. Fate of the beta-cell in the pathophysiology of type 2 diabetes. *J. Am. Pharm. Assoc.* 2009; 49(1): S.10-5.
14. Kolchanov N.A., Voevoda M.I., Kuznetsova T.N., Mordvinov V.A., Ignatieva E.V. Gene networks of lipid metabolism. *Bulletin of the Russian Academy of medical Sciences*. 2006; 120(2): 29-42. (in Russian)
15. Yu Yi-H., Ginsberg H.N. Adipocyte signaling and lipid homeostasis. *Circulation Research*. 2005; 96: 1042-52.
16. Gale S.M., Gastracane V.D., Mantzoros C.S. energy homeostasis, obesity and eating disorders: recent advances in endocrinology. *J. Nutr.* 2004; 134(2): 295-98.
17. Jequier F. Leptin signaling, adiposity and energy balance. *Ann. NY Acad. Sci.* 2002; 967(6778): 379-88.
18. Frubeck G., Gomez-Ambrosi J., Muruzabal F.J., Burrell M.A. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2001; 280(6): E827-47.
19. Ivanov V.V., Lusta I.V., Satrihina T.N., Udincev N.A. Gipoinsulinemiya and lipid peroxidation in emotsionalno-pain stress. *Problems of Endocrinology*. 1990; 36(2): 77-80. (in Russian)
20. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005; 54: 1615-25.
21. Giacco F., Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* 2010; 107(9): 1058-70.
22. Dubinina E.E. Role of reactive oxygen species as signaling molecules in the metabolism of tissues under conditions of oxidative stress. *Problems of Medical Chemistry*. 2001; 47(1): 561-81. (in Russian)
23. Balabolkin M.I., Klebanova E.M., Kreminskaja V.M. Use of ubiquinone (coenzyme Q) in the treatment of diabetes and its complications. *Diabetes Mellitus*. 2007; 4: 37-42. (in Russian)
24. Ahmed N., Thornalley P.J. Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications? *Diabetes. Obes. Metab.* 2007; 9: 233-45.
25. Peyroux J., Sternberg M. Advanced glycation endproducts (AGEs): pharmacological inhibition in diabetes. *Patrol. Biol.* 2006; 54: 405-19.
26. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008; 51(2) 216-26.
27. Szkudelski T. The mechanism of alloxan end streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 2001; 50: 536-46.
28. Ivanov V.V., Vasenjova I.V., Udincev N.A. Lipid peroxidation in rat liver in alloxan diabetes. *Problems of Endocrinology*. 1984; 30(1): 70-3. (in Russian)
29. Grankvist K. Alloxan-induced luminol luminescence as a tool for investigating mechanisms of radical-mediated diabetogenicity. *Biochem.* 1981; 200: 685-90.
30. Ivanov V.V., Shakhristova E.V., Stepovaya E.A., Zhavoronok T.V., Novitsky V.V. Effect of alloxan on spontaneous lipolysis and glutathione system in isolated rat adipocytes. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2011; 151(3): 314-17. (in Russian)
31. Ivanov V.V., Shakhristova E.V., Stepovaya E.A., Zhavoronok T.V., Novitsky V.V. Effect of alloxan on glutathione system and oxidative protein modification in adipocytes of rats at experimental diabetes. *Bulletin of Siberian medicine*. 2011; 10(3): 44-7. (in Russian)
32. Shakhristova E.V., Stepovaya E.A., Ivanov V.V., Nosareva O.L., Dzuman A.N., Ryazantseva N.V., Novitsky V.V. Free-radical oxidation of proteins and lipids in adipocytes under oxidative stress. *Molekuliarnaia meditsina*. 2014; 1: 59-64. (in Russian)
33. Liu Q., Sun L., Tan Y., Wang G., Lin X., Cai L. Role of iron deficiency and overload in the pathogenesis of diabetes and diabetic complications. *Curr. Med. Chem.* 2009; 16(1): 113-29.
34. Festa M., Ricciardelli G., Mele G., Pietropaolo C., Ruffo A., Colonna A. Overexpression of H ferritin and up-regulation of iron regulatory protein genes during differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes. *J Biol. Chem.* 2000; 275(47): 36708-12.
35. Ivanov V.V., Shakhristova E.V., Stepovaya E.A., Zhavoronok T.V., Novitsky V.V. Lipid peroxidation and the glutathione system in adipose tissue of rats with alloxan diabetes. *Bulletin of the Russian Academy of medical Sciences*. 2010; 30(6): 101-4. (in Russian)

36. Poglio S., Galvani S., Bour S., Andre M., Prunet-Marcassus B., Penicaud L. et al. Adipose tissue sensitivity to radiation exposure. *Am. J. Pathol.* 2009; 174(1): 44-53.
37. Galinier A., Carriere A., Fernandez Y., Carpeno C., Andre M., Caspar-Bauguil S. et al. Adipose tissue pro-adipogenic redox changes in obesity. *Biol. Chem.* 2006; 281: 12682-87.
38. Zhou Q.G., Peng X., Hu L.L., Xie D., Zhou M., Hou F.F. Advanced oxidation protein products inhibit differentiation and activate inflammation in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Cell Physiol.* 2010; 225(1): 42-51.
39. Grimsrud P.A., Picklo M.J., Griffin T.J., Bernlohr D.A. Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance: identification of adipocyte fatty acid-binding protein as a cellular target of 4-hydroxynonenal. *Mol. Cell. Proteomics.* 2007; 6(4): 624-37.
40. Curtis J.M., Grimsrud P.A., Wright W.S. Downregulation of adipose glutathione S-transferase A4 leads to increased protein carbonylation, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction. *Diabetes.* 2010; 59(5): 1132-42.
41. Wang G., Wang J., Ma H., Khan M.F. Increased nitration and carbonylation of proteins in MRL+/+ mice exposed to trichloroethene: potential role of protein oxidation in autoimmunity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009; 237(2): 188-95.
42. Bartness T.J., Song C.K. Thematic review series: adipocyte biology. Sympathetic and sensory innervation of white adipose tissue. *J. Lipid. Res.* 2007; 48(8): 1655-72.
43. Brasaemle D.L., Dolios G., Shapiro L. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 46835-42.
44. Garcia A., Subramanian V., Sekowski A., Bhattacharyya S., Love M.W., Brasaemle D.L. The amino and carboxyl termini of perilipin A facilitate the storage of triacylglycerols. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 8409-16.
45. Miyoshi H., Souza S.C., Endo M., Sawada T., Perfield J.W. 2nd, Shimizu C. et al. Perilipin overexpression in mice protects against diet-induced obesity. *J. Lipid Res.* 2010; 51(5): 975-82.
46. Robidoux J., Martin T.L., Collins S. Beta-adrenergic receptors and regulation of energy expenditure: a family affair. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2004; 44: 297-323.
47. Bastard J.P., Maachi M., Van Nhieu J.T., Jardel C., Bruckert E., Grimaldi A. et al. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87: 84-9.
48. Shakhristova E.V., Ivanov V.V., Stepovaya E.A., Novitsky V.V. Influence of superoxide anion radical and glutathione on lipolysis in adipocytes of rats at oxidative stress induced by alloxan. *Siberian Journal of Science.* 2012; 4(5): 258-66. Available at: <http://sjs.tpu.ru/journal/article/view/458> (accessed 4 February 2014). (in Russian)
49. Jaworski K., Sarkadi-Nagy E., Duncan R.E., Ahmadian M., Sul H.S. Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 2007; 293: G1-4.
50. Jocken J.W., Blaak E.E. Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity. *Physiol. Behav.* 2008; 94(2) 219-30.
51. Sztalryd C., Xu G., Dorward H., Tansey J.T., Contreras J.A., Kimmel A.R. et al. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *Cell. Biol.* 2003; 160: 1093-103.
52. Tsujita T. Basal lipolysis in epididymal fat cells from streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2006; 52(1): 47-53.
53. Brasaemle D.L., Rubin B., Harten I.A., Gruia-Gray J., Kimmel A.R., Londos C. Perilipin a increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *Biol. Chem.* 2000; 275(49): 38486-93.
54. Choi Y.H., Park S., Hockman S., Zmuda-Trzebiatowska E., Svennelid F., Haluzik M. et al. Alterations in regulation of energy homeostasis in cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B-null mice. *J. Clin. Invest.* 2006; 116: 3240-51.
55. Graciano M.F., Valle M.M., Kowluru A., Curi R., Carpinelli A.R. Regulation of insulin secretion and reactive oxygen species production by free fatty acids in pancreatic islets. *Islets.* 2011; 3(5): 213-23.

Поступила 14.10.14

Received 14.10.14

**Сведения об авторах:**

Иванов Владимир Владимирович — к.б.н., доцент каф. биохимии и молекулярной биологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России

Шахристовая Евгения Викторовна — к.м.н., руководитель научно-образовательного центра молекулярной медицины ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, e-mail: shaxristova@yandex.ru

Степовая Елена Алексеевна — д.м.н., проф. каф. биохимии и молекулярной биологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России

Носарева Ольга Леонидовна — к.м.н., доцент каф. биохимии и молекулярной биологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России

Федорова Татьяна Сергеевна — д.м.н., проф. каф. биохимии и молекулярной биологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России

Новицкий Вячеслав Викторович — д.м.н., проф., акад. РАМН, зав. кафедрой патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России

Сабурина И.Н.<sup>1,2</sup>, Колокольцова Т.Д.<sup>1,2</sup>, Копаев С.Ю.<sup>3</sup>, Зурина И.М.<sup>1</sup>, Борзенко С.А.<sup>3</sup>

## Опыт культивирования клеток переднего эпителия роговицы глазного яблока человека

<sup>1</sup> — ФГБНУ «НИИ общей патологии и патологической физиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

<sup>2</sup> — ГБОУ ДПО Российская медицинская Академия последипломного образования, 123995, Москва, ул. Баррикадная, 2/1

<sup>3</sup> — Центр фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Федорова» Минздрава, 127486, Москва, ул. Бескудниковский бульвар, 59а

Эпителий роговицы взрослого организма чаще всего подвергается внешнему воздействию, повреждается и восстанавливается за счет стволовых клеток лимба. Повреждение эпителиального слоя роговицы приводит к нарушению прозрачности и потере зрения. Недавно показано, что стволовые клетки встречаются в том числе и в эпителиальном слое. Создание культуры клеток эпителиального слоя роговицы позволит понять механизмы поведения, дифференцировки клеток, особенности их метаболизма и реакцию клеток на внешние воздействия в норме и патологии. Культивированные эпителиальные клетки роговицы рассматриваются, кроме того, как высокоперспективные для конструирования биоискусственной роговицы. Цель работы — выделение клеток переднего эпителия донорской роговицы глаза человека и изучение их морфофункциональных характеристик при культивировании *in vitro*. Результаты исследования показали возможность культивирования эпителиальных клеток *in vitro*. Наблюдаемое изменение морфологии клеток, характерный поточный их рост, а также активная пролиферация клеток и увеличивающаяся экспрессия маркеров мезенхимного ряда свидетельствует, по нашему мнению, об эпителио-мезенхимном переходе клеток переднего эпителия роговицы глаза человека при длительном их культивировании. Полученные культуры клеток могут быть использованы для дальнейшего исследования патологических процессов в клетках при тестировании лекарственных препаратов или контроле фототоксичности разных излучений.

**Ключевые слова:** роговица, эпителий роговицы, культура клеток переднего эпителия, стволовые клетки, мезенхимные стволовые клетки, маркеры клеток, цейттраферная микроскопия

Saburina I.N.<sup>1,2</sup>, Kolokoltsova T.D.<sup>1,2</sup>, Kopayev S.Yu.<sup>3</sup>, Zurina I.M.<sup>1</sup>, Borzenok S.A.<sup>3</sup>

## Experience of culturing anterior epithelial corneal cells from human eye ball

<sup>1</sup> — FSBSI «Institute of general pathology and pathophysiology», 8, Baltiyskaya st., 125315, Moscow, Russia

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

<sup>3</sup> — Fyodorov Eye Microsurgery Complex FSBI, 59a, Beskudnikovsky boulevard, 127486, Moscow, Russia

Adult corneal epithelium is often exposed to environmental stress, injured and repaired by limbal stem cells. Injury of corneal epithelial layer leads to reduction of visual clarity and loss of vision. Recently it was shown that epithelial layer also contains stem cells. Obtaining cell culture of corneal epithelium will allow understanding mechanisms of cell behavior and differentiation, their metabolism and reaction on environmental stress in health and disease. Moreover, cultured corneal epithelial cells can be considered as a promising material for constructing bioartificial cornea. The aim of this study was to isolate cells of anterior corneal epithelium from human donor cornea and to study their morphological and functional characteristics *in vitro*. The results of our study showed the possibility of culturing epithelial cells *in vitro*. The observed changes in cell morphology, their flow growth character as well as active proliferation and up-regulation of mesenchymal markers expression, indicate, in our opinion, epithelial-mesenchymal transition taking place in long-lasting culture of human anterior corneal epithelial cells. The obtained cultures can be used for further studies of pathological processes taking place in cells during drugs testing or controlling the phototoxic effect of different types of emission.

**Key words:** cornea; corneal epithelium, cell culture of anterior epithelium, stem cells, mesenchymal stem cells; cell markers; time-lapse microscopy

**Для корреспонденции:** Сабурина Ирина Николаевна — д-р биол.наук, зав. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «НИИ Общей патологии и патофизиологии»; профессор кафедры общей патологии и патофизиологии ГБОУ ДПО Российская медицинская Академия последипломного образования Минздрава России. E-mail: saburina@mail.ru

Эпителий роговицы взрослого организма чаще всего подвергается внешнему воздействию, повреждается и восстанавливается за счет стволовых клеток лимба. Повреждение эпителиального слоя роговицы приводит к нарушению прозрачности и потере зрения. Исследо-



ваниями последних лет показано, что стволовые клетки обнаруживаются в том числе и в эпителиальном слое роговицы [1]. Создание культуры клеток переднего слоя роговицы позволяет понять механизмы поведения, дифференцировки клеток, особенности их метаболизма и оценить характер реакции клеток на внешние воздействия. Культивированные эпителиальные клетки роговицы рассматриваются, кроме того, как высокоперспективные в качестве модели для исследования и источника клеток для конструирования биоискусственной роговицы. *Цель работы* — выделение клеток переднего эпителия донорской роговицы глаза человека и изучение их морфофункциональных характеристик при культивировании *in vitro*.

### Методика

#### *Выделение первичных культур клеток переднего эпителия роговицы*

Клетки переднего эпителия роговицы глазного яблока человека выделяли из аутопсийного материала, предоставленного Глазным тканевым банком Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Федорова» Минздрава России. Для выделения клеток использовали 12 аутопсированных глаз (от 12 доноров 65—68 лет).

Глазные яблоки освобождали от окружающих тканей, промывали в 70% этиловом спирте в течение не более 2—3 минут, затем в холодном растворе Хэнкса с антибиотиками в стандартной концентрации — пенициллин 100 Ед/мл, стрептомицин 100 мкг/мл и транспортировали в лабораторию. Работу по выделению и культивированию клеток проводили в ламинарном боксе с соблюдением правил асептики.

Из промытых глазных яблок с помощью трепана и ножниц выделяли роговицу, подвергали ее ферментативной обработке в растворах коллагеназы А (Sigma, 2 мг/мл) и 0,25%-ном растворе трипсина, при температуре 37°C в течение 40 мин. Под стереомикроскопом в ламинарном боксе отделяли клетки рогового эпителия и помещали в пластиковые чашки Петри в концентрации  $100 \times 10^3$  кл/мл в питательной среде DMEM/F12 (1:1, ПанЭко, Россия) с добавлением глутамина (2мМ/L, ПанЭко, Россия), гентамицина (50 мкг/мл, ПанЭко, Россия), ИТС (1:100, ПанЭко, Россия) и 10% сыворотки крови плодов коровы (HyClone, США).

#### *Культивирование клеток*

Все выделенные штаммы клеток культивировали в CO<sub>2</sub>инкубаторе в стандартных условиях (37°C; 5%CO<sub>2</sub>) в чашках Петри или в планшетах. Смену среды осуществляли через 24 ч в первичной культуре кле-

ток, затем через 48 ч, поддерживали клетки до формирования плотных островков роста либо формирования монослоя клеток. На втором и последующих пассажах клетки пересевали через 3—5 сут. Для снятия клеток использовали растворы версена и 0,25%-ного трипсина. Клетки пересевали на новую чашку Петри в концентрации  $3 \times 10^5$  кл/мл ростовой среды.

Контроль морфологии и характер роста клеток изучали на приборе Cell-IQ, производства ChipMan Technologies (Финляндия). Для контроля клетки выращивали в 12- или 24-луночных пластиковых планшетах. Клетки засеивали в плотности  $10 \times 10^3$  кл/лунку и помещали в термостатируемую камеру прибора Cell-IQ при стандартных условиях (37°C; 5%CO<sub>2</sub>) в течение 3 сут.

#### *Исследование иммунофенотипа культур клеток*

Исследование иммунофенотипа культур клеток проводили методом проточной цитофлуориметрии на приборе FC500 (BeckmanCoulter, США). Анализировали экспрессию поверхностных белков: CD14, CD45, CD34, CD90 и CD105 в первичных культурах клеток, а также на 2-м—4-м пассажных уровнях.

Для проведения анализа клетки, выращенные в течение 72 ч, снимали с чашек Петри с использованием растворов версена и 0,25%-ного трипсина, центрифугировали (7 мин,  $g = 100$ ), к полученному осадку добавляли 700 мкл раствора фосфатно-солевого буфера (pH = 7,4) с добавлением 1% эмбриональной сыворотки крови плодов коровы и разливали по 100 мкл. К каждой пробе согласно рекомендованным производителями протоколам добавляли антитела, конъюгированные с флуоресцентными метками FITC fluorescein isothiocyanate, PE — phycoerythrin, PC5 Phycoerythrin-Cyanin 5.1, PTRX — Phycoerythrin-TexasRed-X (BeckmanCoulter, США) и инкубировали 15 мин при комнатной температуре в темноте. После этого пробы центрифугировали (5 мин, 400g), осадок ресуспендировали в 1 мл раствора фосфатно-солевого буфера (pH = 7,4) с добавлением 1% эмбриональной сыворотки крови плодов коровы и переносили в пробирки для проточного цитофлуориметра. Результаты оценивали на проточном цитофлуориметре FC500 с помощью программы CXP Software.

### Результаты и обсуждение

Первично выделенные клетки переднего эпителия роговицы активно прикреплялись к дну культурального пластика в чашке Петри через 5—7 ч, смену питательной среды производили не ранее чем через 24 ч после посева. Через 1 сут. после смены среды наблюдались островки округлых эпителиальных клеток. Встречались также медленно делящиеся

стромальные, фибробластоподобные одноядерные клетки, многоядерные клетки наблюдались редко (не более 0,1%) (рис. 1,А). Первично выделенные клетки формировали монослой только к 5-м—7-м сут. культивирования. Контроль контаминации клеток методами окрашивания флюорохромами Dapi и Hoechst 33258 показал отсутствие микоплазменной и бактериальной контаминации в культуре клеток. Отсутствие вирусов подтверждено методами ИФА- и ПЦР-анализа.

Культура клеток переднего эпителия роговицы после 1-го и 2-го пассирования *in vitro* формировала довольно ровный монослой, представленный гомогенной популяцией округлых или полигональных клеток эпителиального фенотипа, плотно прилегающих друг к другу (рис. 1,Б). В популяции практически исчезли стромальные фибробластоподобные клетки.

Характер роста клеток, их морфология и размеры значительно изменялись при последующем культивировании. На уровне 4-го—5-го пассажей монослой клеток был представлен более крупными биполярными клетками с 1 ядром. Клетки активно делились и формировали плотный монослой уже к концу 3-х сут. культивирования (рис. 1,В). Наблюдался характерный поточный рост клеток.

Культуры клеток на первых пассажах, как правило, были представлены мелкими клетками (рис. 2). До 97% клеток имели размеры от 7 до 10 мкм, число клеток с размером до 12—15 мкм составляло не более 2%. При последующих пересевах клетки существенно не увеличивались в размерах, до 98% клеток имели размеры от 7 до 14 мкм.

Подсчет количества живых клеток в поле зрения в монослой с помощью цифровой фоторегистрации на приборе Cell-IQ Imagen. Как видно из рис. 3, на 2-м пассаже клетки росли довольно медленно и число их в поле зрения удваивалось только к концу культивирования (72 ч). На 4-м пассаже число клеток удваивалось уже через 40—45 ч и индекс пролиферации достигал к концу 3-х сут. культивирования значения 3 и более, что свидетельствует о более высокой пролиферативной активности клеток.

Анализ экспрессии маркеров культуры клеток переднего эпителия роговицы методом проточной цитофлуориметрии на разных пассажах был применен для того, чтобы охарактеризовать исходную популяцию выделенных клеток и проанализировать изменения их фенотипа, дифференцировки, а также сравнить функциональную активность исследуемых клеток эпителия роговицы на разных сроках культивирования *in vitro*.

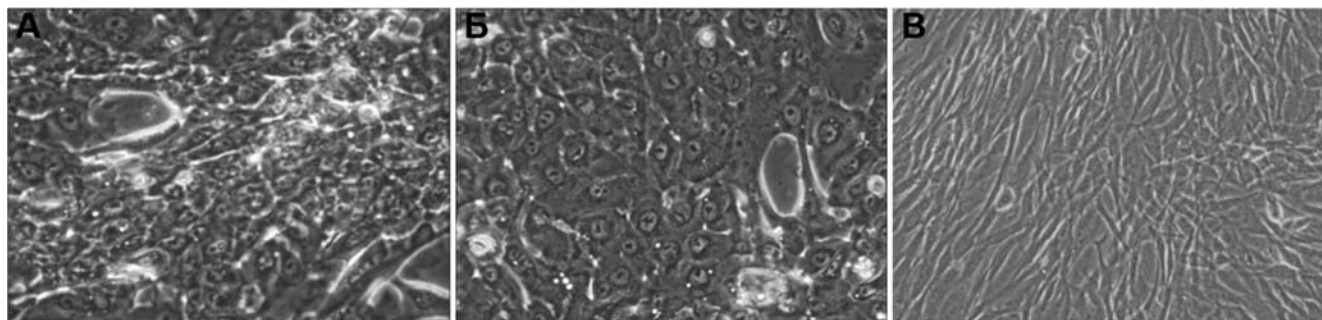


Рис. 1. Изменение морфологии клеток переднего эпителия роговицы глаза человека на разных пассажных уровнях при культивировании *in vitro*. 1-й пассаж (А), 2-й пассаж (Б), 5-й пассаж (В). Световая микроскопия, ув. x20.

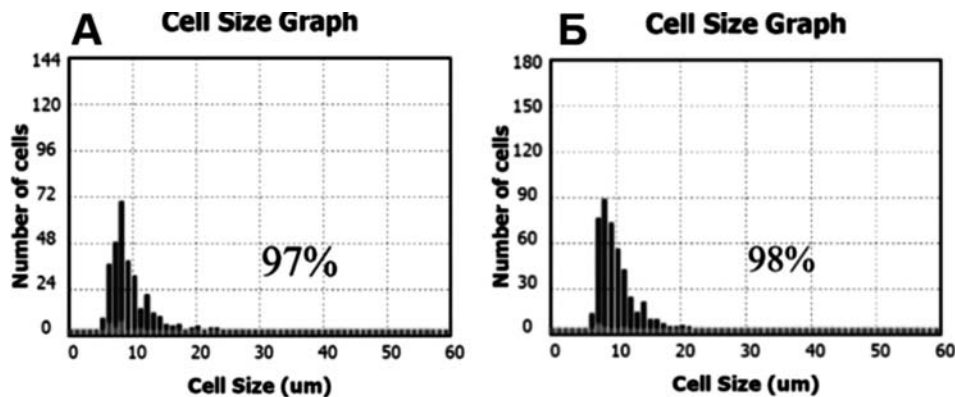


Рис. 2. Размеры клеток переднего эпителия глаза, снятых с культурального флакона, после культивирования *in vitro* в течение 1 (А) или 4 пассажей (Б).

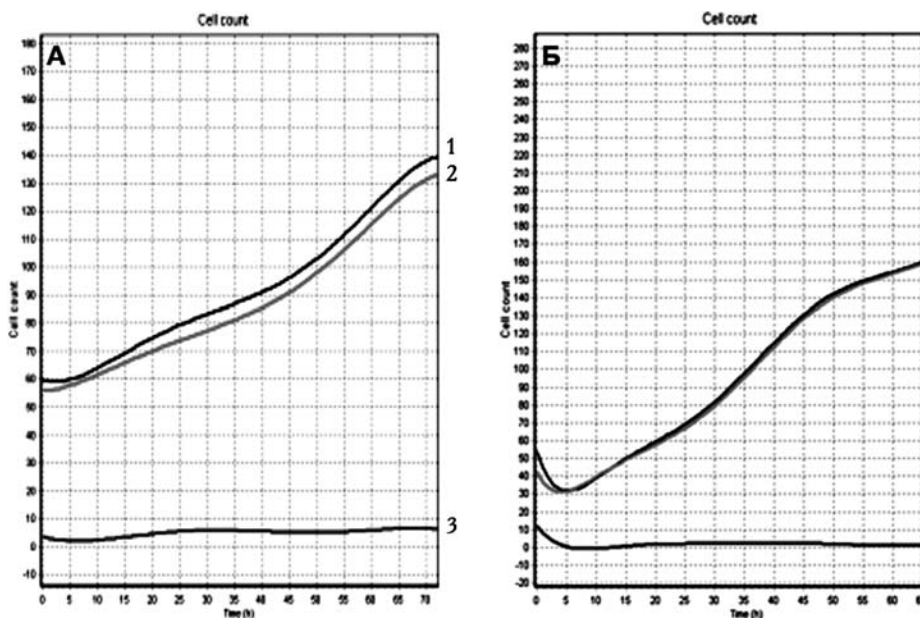


Рис. 3. Изменение количества клеток переднего эпителия роговицы глаза человека при культивировании в течение 3 сут. в монослое на 2 (А) и 5 пассаже (Б). Кривая 1 — общее число клеток; кривая 2 — число живых клеток; кривая 3 — число делящихся клеток

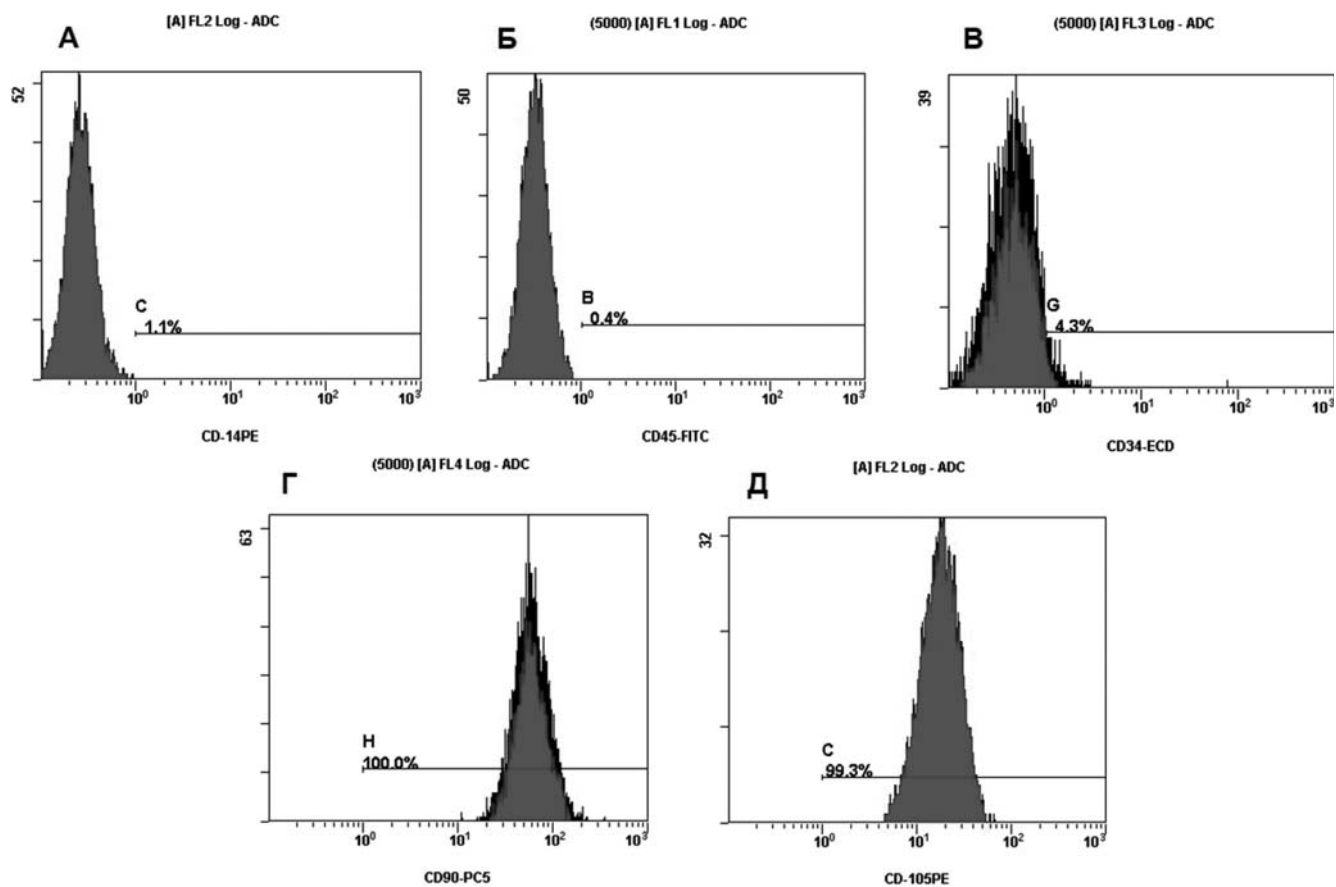


Рис. 4. Данные проточной цитофлуориметрии по экспрессии поверхностных маркеров клетками переднего эпителия роговицы глаза человека на 5-м пассаже. А — CD14; Б — CD45; В — CD34; Г — CD90; Д — CD105.

Результаты иммунофенотипирования клеток переднего эпителия роговицы на разных пассажных уровнях представлены в таблице.

Отмечено, что при культивировании эпителия роговицы количество клеток, экспрессирующих такие маркеры, как CD14, CD45, CD34, CD90 и CD105 изменялось с ростом числа пассажей. Как видно из таблицы, в культуре клеток эпителия роговицы на 2-м пассаже (P2) по сравнению с первичной культурой доля клеток, позитивно экспрессирующих CD90<sup>+</sup>, увеличивалась от 77,3% до 79,7%, число CD105<sup>+</sup> клеток от 48,9% до 53,5% от общего количества клеток в культуре. Доля CD34 позитивных клеток варьировала в пределах 4,4—3,7%, а число клеток, экспрессирующих CD45 или CD14, уменьшалось от 8,6% до 6,9% и от 10,7% до 8,6% соответственно. Эти небольшие изменения связаны, в первую очередь, с уменьшением количества клеток гемопоэтического ряда за счет пассирования культуры. Тем самым достигалась большая однородность и гомогенность клеточной культуры по сравнению с исходной популяцией первично-выделенных клеток.

Данные иммунофенотипирования клеток эпителия на последующих пассажах (3-й и 5-й пассажи) подтверждали также снижение числа клеток, имеющих маркеры кроветворного ряда CD14<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup>, однако наблюдалось значительное увеличение количества клеток, экспрессирующих маркеры мезенхимного ряда CD90 и CD105 до 100% и 99,3%, соответственно (таблица и рис. 4). Результаты проточной цитофлуориметрии клеток эпителия роговицы, культивированных в течение 5 пассажей *in vitro*, представлены на рис. 4.

Передний эпителий роговицы является слоем, главные функции которого заключаются в обеспечении прозрачности, защиты от внешнего воздействия, но в то же время и регенерации ткани после повреждения за счет активно делящихся или стволовых клеток. Основным источником стволовых клеток эпителия роговицы являются клетки лимба, однако и в эпителии роговицы также могут быть недифференцированные эпителиальные клетки. Ранее была показана пластичность взрослых эпителиальных клеток роговицы по способности изменять фенотип в ответ на сигналы эмбриональной дермы [2]. Это позволило авторам пред-

положить, что эпителиальные клетки могут репрограммироваться. В другой работе отмечено, что клетки эпителия роговицы могут трансдифференцироваться в другие типы клеток, в том числе в клетки волосных фолликулов [3]. Пластичность эпителия роговицы отмечается и в других работах [4].

Опыт многих исследователей показал, что для культивирования клеток эпителия используют различные субстраты или компоненты внеклеточного матрикса, как, например, фидерный слой клеток или амниотическая мембрана, а также предварительное покрытие коллагеном I или IV типа или желатином [2, 5, 6, 7]. Sun и Lavkert (2004) выращивали эпителиальные клетки роговицы кролика в присутствии фидерного слоя мышечных клеток 3T3. Культивированные таким образом клетки имели эпителиальную природу, что подтверждалось по экспрессии кератина K3, и сохраняли пролиферативную активность. Кроме того, авторы снижали количество сыворотки в питательной среде, либо добавляли сыворотку крови донора [1]. В наших исследованиях клетки культивировались на пластике и в питательной среде с добавлением только сыворотки плодов коровы (10%). Возможно, наблюдаемые уже на 2-м—4-м пассажах изменения характеристик клеток обусловлены именно этими факторами.

Известно, что контаминация клеток микоплазмой существенно влияет на результаты исследований, изменяя при этом морфологию и функции клеток [8]. Поэтому отсутствие контаминантов позволило нам исключить получение ложноположительных результатов.

Исследование иммунофенотипа культур клеток является показателем гомогенности или гетерогенности выделенных клеточных культур и проводится с помощью специфических моноклональных антител, характерных для стволовых, прогениторных и дифференцированных клеток тканей глаза. Наблюдаемое изменение иммунофенотипического профиля культивируемых клеток, скорее всего, обусловлено влиянием условий культивирования, потенциально высокой пластичностью эпителиальных клеток, сопровождающейся эпителио-мезенхимным переходом данной культуры при монослойном культивировании. Это доказывает увеличение экспрессии маркеров, характерных для мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, таких,

Таблица

Иммунофенотипирование культуры клеток переднего эпителия роговицы на разных пассажных уровнях

|          | CD14        | CD45       | CD34       | CD90        | CD105       |
|----------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|
| 1 пассаж | 10,7 ± 2,71 | 8,6 ± 1,19 | 4,4 ± 2,04 | 77,3 ± 2,45 | 48,9 ± 1,53 |
| 2 пассаж | 8,6 ± 0,74  | 6,9 ± 0,86 | 3,7 ± 0,89 | 79,7 ± 0,91 | 53,5 ± 0,78 |
| 3 пассаж | 5,5 ± 0,47  | 4,9 ± 0,86 | 3,7 ± 0,37 | 90,7 ± 0,76 | 75,5 ± 0,48 |
| 5 пассаж | 1,1 ± 0,34  | 0,4 ± 0,38 | 4,3 ± 0,32 | 100 ± 0,54  | 99,3 ± 0,17 |

как CD90 и CD105. Эпителио-мезенхимный фенотип клеток подтверждается, кроме того, экспрессией виментина практически всеми клетками на 5 пассаже. Ранее нами было показано, что изменение эпителиоидного фенотипа клеток на полигональный, а затем на биполярный объясняется эпителио-мезенхимальной пластичностью клеточной культуры, которая проявляется при длительном монослойном культивировании практически всех эпителиальных культур клеток [9]. Аналогичные результаты представлены по эпителио-мезенхимному переходу эпителиальных клеток лимба [7].

В работе болгарских исследователей рассматриваются несколько типов клеток, выделяемых из роговицы глаза человека [1]. Мультипотентные, фибробластоподобные клетки, имеющие следующий профиль маркеров: CD34-, CD45-, CD14-, CD105+. Профиль маркеров этих клеток отличался от такового мезенхимных клеток костного мозга или других взрослых клеток, однако близок к характеристикам мелких эмбрионально-подобных стволовых клеток взрослого организма. Другая группа фибробластоподобных клеток, формирующих сфероиды в культуре, были мультипотентны и экспрессировали маркеры мезенхимоподобных клеток: CD105+, CD106+, CD90+, CD45-, CD14- и т.д. Сходство характеристик выделенных нами и культивированных *in vitro* клеток эпителия свидетельствует о присутствии таких же типов клеток в культуре и подтверждает их эпителио-мезенхимную пластичность.

Присутствие стволовых или мезенхимоподобных клеток в роговице дает нам новые знания не только о составе клеток, и их возможной пластичности, но и о их взаимоотношениях. Понимание этих взаимоотношений, как и поведения клеток при физиологических и патологических условиях, позволит нам лучше понять процессы заживления роговицы или ее репарации.

### Заключение

Результаты исследования показали возможность культивирования эпителиальных клеток *in vitro*. Наблюдаемое изменение морфологии клеток, характерный поточный их рост, а также активная пролиферация клеток и увеличивающаяся экспрессия маркеров мезенхимного ряда свидетельствует, по нашему мнению, об эпителио-мезенхимных переходах клеток переднего эпителия роговицы глаза человека при длительном их культивировании. Пластичность эпителиальных клеток в культуре делает эти клетки перспективным источником для регенеративной медицины. Полученные культуры клеток могут быть использованы для дальнейшего исследования патологических процессов в клетках при контроле лекарственных препаратов или фототоксичности разных излучений.

### Список литературы

1. Takacs L., Toth, E., Berta, A., Vereb, G. Stem cells of the adult cornea: from cytometric markers to therapeutic applications. *Cytometry Part A*. 2009; 75(1): 54-66.
2. Gospodarowicz D., Greenburg G., Alvarado J. Transplantation of cultured bovine corneal endothelial cells to rabbit cornea: clinical implications for human studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1979; 76(1):464-8.
3. Pearton D.J., Yang Y., Dhouailly D. Transdifferentiation of corneal epithelium into epidermis occurs by means of a multistep process triggered by dermal developmental signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; 102(10): 3714-9.
4. Boulton V., Albon J., Drant V. Stem cells in the Eye. In: «Principles of tissue engineering». Ed.by Lanza L., Langer R., Vacanti J. *Academic Press*. 2011; 1399-1440.
5. Kobayashi T., Yoshioka R., Shiraishi A., Ohashi Y. New technique for culturing corneal epithelial cells of normal mice. *Molecular vision*. 2009; 15: 1589.
6. Sun T.T., Lavker R.M. Corneal epithelial stem cells: past, present, and future. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. — *Nature Publishing Group*, 2004; 9. — №3: 202-207.
7. Li W., Hayashida Y., He H., Kuo C.L., Tseng S.C. The fate of limbal epithelial progenitor cells during explant culture on intact amniotic membrane. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2007; 48. №2: 605-613.
8. Колокольцова Т.Д., Сабурин И.Н. Патологические аспекты микоплазменной контаминации клеточных культур. *Патогенез*. 2013. №3: 29-31.
9. Сабурин И.Н., Репин В.С. 3D-культивирование: от отдельных леток к регенерационной ткани (к вопросу о феномене эпителио-мезенхимальной пластичности). *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2010; 5. №2: 75-86.

### References

1. Takacs L., Toth, E., Berta, A., Vereb, G. Stem cells of the adult cornea: from cytometric markers to therapeutic applications. *Cytometry Part A*. 2009; 75. №1: 54-66.
2. Gospodarowicz D., Greenburg G., Alvarado J. Transplantation of cultured bovine corneal endothelial cells to rabbit cornea: clinical implications for human studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1979; 76. №1: 464-468.
3. Pearton D.J., Yang Y., Dhouailly D. Transdifferentiation of corneal epithelium into epidermis occurs by means of a multistep process triggered by dermal developmental signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; 102. №10: 3714-3719.
4. Boulton V., Albon J., Drant V. Stem cells in the Eye. In: «Principles of tissue engineering». Ed.by Lanza L., Langer R., Vacanti J. *Academic Press*. 2011: 1399-1440.
5. Kobayashi T., Yoshioka R., Shiraishi A., Ohashi Y. New technique for culturing corneal epithelial cells of normal mice. *Molecular vision*. 2009; 15: 1589.
6. Sun T. T., Lavker R. M. Corneal epithelial stem cells: past, present, and future. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. — *Nature Publishing Group*, 2004; 9. №3: 202-207.
7. Li W., Hayashida Y., He H., Kuo C.L., Tseng S.C. The fate of limbal epithelial progenitor cells during explant

culture on intact amniotic membrane. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2007; 48. №2: 605-613.

8. Kolokoltsova T.D., Saburina I.N. Pathological aspects of mycoplasma contamination in cell cultures. *Pathogenesis*. 2013. №3: 29-31. (In Russian).

9. Saburina I.N., Repin V.S. 3D culture: from single cells to regenerative tissue (revisiting phenomena of epitheli-

al-mesenchymal plasticity). *Cell transplantology and tissue engineering*. — 2010; 5. — №2: 75-86. (In Russian).

Поступила 11.11.14

Received 11.11.14

### Сведения об авторах:

*Колокольцова Тамара Дмитриевна* — д-р биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «НИИ Общей патологии и патофизиологии»; профессор кафедры общей патологии и патофизиологии ГБОУ ДПО Российская медицинская Академия последипломного образования Минздрава России

*Кобаев Сергей Юрьевич* — канд. мед. наук, старший научный сотрудник ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Федорова» Минздрава России

*Зурина Ирина Михайловна* — мл. науч. сотр. лаборатории клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

*Борзенко Сергей Анатольевич* — д-р мед. наук, профессор, академик РАЕН, руководитель центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Федорова»

Чаусова С.В.<sup>1</sup>, Гуревич К.Г.<sup>3</sup>, Бондарева Г.П.<sup>2</sup>, Филатов О.Ю.<sup>3</sup>, Малышев И.Ю.<sup>3,4</sup>

## ***Возможность диагностики непереносимости нестероидных противовоспалительных препаратов по изменению хемилюминесцентного свечения полиморфно-ядерных лейкоцитов периферической крови***

<sup>1</sup> — ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

<sup>2</sup> — ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, отделение «Бронхиальной астмы»; Москва, Каширское ш., 24, корп.2

<sup>3</sup> — ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России; 103473, Москва, ул. Делегатская, 20/1

<sup>4</sup> — ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

*В статье исследовали интенсивность стимулированной сульфатом бария люминолзависимой хемилюминесценции (СЛХЛ) крови после предварительной инкубации проб крови с салицилатом натрия, метамизолом натрия или диклофенаком натрия, используемыми в различных концентрациях, у здоровых доноров и больных с непереносимостью аспирина и/или анальгина и/или диклофенака. Выявлены статистически значимые различия показателей СЛХЛ крови у здоровых доноров и больных с непереносимостью указанных препаратов, что открывает возможность применения хемилюминесцентного метода для диагностики непереносимости нестероидных противовоспалительных препаратов.*

**Ключевые слова:** хемилюминесценция, непереносимость нестероидных противовоспалительных препаратов, салицилат натрия, метамизол натрия, диклофенак натрия

Chausova S.V.<sup>1</sup>, Gurevich K.G.<sup>3</sup>, Bondareva G.P.<sup>2</sup>, Filatov O.Ju.<sup>3</sup>, Malyshev I.Y.<sup>3</sup>

## ***Possibility of diagnostics of the non-steroidal anti-inflammatory drugs intolerance with a change in the chemiluminescent glow of the polymorphonuclear leukocytes of the peripheral blood***

<sup>1</sup> — Russian National Research Medical University, 1, Ostrovityanova st., Moscow, 117997, Russia

<sup>2</sup> — Institute of Immunology, 24/2, Kashirskaya st., Moscow, 115478, Russia

<sup>3</sup> — Moscow State Medical and Dental University, 20/1, Delegatskaya st., Moscow, 103473, Russia

<sup>4</sup> — FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8, Baltiiskaya str., 125315, Moscow, Russia

*We investigated the intensity of barium sulfate stimulated luminol-dependent chemiluminescence (SLCL) of pre-incubated blood with various concentrations of sodium salicylate, sodium metamizol or sodium diclofenac. Blood was received from healthy donors and patients with intolerance to aspirin and / or sodium metamizol and / or sodium diclofenac. Revealed valid differences in SLCL of blood received from healthy donors and patients with intolerance to these drugs allows us to use chemiluminescence method for the diagnosis of intolerance to non-steroidal anti-inflammatory drugs.*

**Key words:** chemiluminescence, non-steroidal anti-inflammatory drugs intolerance, sodium salicylate, sodium metamizol, sodium diclofenac

Аллергические и псевдоаллергические реакции на антигены различного происхождения широко распространены [1, 2]. В последние годы стремительно растет количество больных, страдающих не-

переносимостью нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП), что обуславливает острую необходимость в диагностических лабораторных методиках.

Как правило, реакции непереносимости НПВП относятся к псевдоаллергическим, что не позволяет использовать обычные алерго-тесты для их своевременного выявления и диагностики до развития осложнений. Между тем, реакции непереносимости НПВП могут включать в себя такие жизнеугрожа-

**Для корреспонденции:** Чаусова Светлана Витальевна — канд. мед. наук, доцент кафедры общей патологии медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова. 117997, Москва, ул. Островитянова, 1. E-mail: svetlana\_chau@mail.ru

ющие состояния, как бронхиальная астма, отек Квинке, анафилактический шок и др. Поэтому до начала применения НПВП необходима простая недорогая методика быстрого скринингового выявления пациентов с непереносимостью НПВП, что позволит снизить побочные эффекты лекарственной терапии.

Перспективными в настоящее время считаются тесты *in vitro* нового поколения, позволяющие изучать аспиринспецифическую активацию лимфоцитов периферической крови, такие, как сульфидолейкотриеновый тест (FLOW-CAST) [3], тест генерации 15-гидроксиэйкозатетраеновой кислоты лимфоцитами периферической крови (ASPI-Test) [4]. Однако, к сожалению, методики, разработанные в условиях *in vitro*, не всегда достаточно чувствительны и специфичны, весьма дорогостоящи и требуют специально обученных сотрудников.

В клинической практике диагноз повышенной чувствительности к НПВП основывается, главным образом, на рискованных провокационных тестах. Так, подъязычный провокационный тест с аспирином и другими НПВП до сих пор остается стандартом в диагностике непереносимости данных препаратов, однако у ряда больных при проведении теста могут развиваться жизнеугрожающие состояния [5].

С нашей точки зрения, новые возможности для выявления повышенной чувствительности к лекарственным препаратам, в том числе НПВП, открывает применение метода хемилюминесценции лейкоцитов периферической крови.

В 1985 г. был открыт феномен специфического угнетения аллергеном стимулированной сульфатом бария люминол-зависимой хемилюминесценции лейкоцитов (СЛХЛ) периферической крови sensibilizированных людей [6]. На основе этого феномена был разработан тест для выявления специфической sensibilizации к пылевым, бытовым, лекарственным (пенициллин) и другим аллергенам. Использованные аллергены были либо полноценными антигенами, либо гаптенами (пенициллин), образующими в организме комплексный антиген. Вместе с тем, оставалась неизвестной возможность использования хемилюминесцентного теста для выявления повышенной чувствительности к псевдоаллергенам, в частности к НПВП. Для определения зависимости изменения СЛХЛ крови от концентрации используемых НПВП у здоровых доноров и пациентов с непереносимостью данных препаратов было проведено настоящее исследование.

*Цель работы* — определение общих закономерностей изменения СЛХЛ крови под влиянием салицилата, метамизола и диклофенака натрия у здоровых

доноров и пациентов с непереносимостью этих препаратов.

### Методика

Объектом исследования были 75 больных (49 женщин и 26 мужчин) с непереносимостью аспирина и/или анальгина и/или диклофенака в возрасте от 19 до 70 лет. Из этих больных у 51 непереносимость указанных НПВП проявлялась в виде поражения органов дыхания (аспириновая астма, ринит), у 24 — в виде крапивницы, отека Квинке. Критерии включения пациентов в исследование: приступы экспираторного диспноэ, ринит, крапивница, отек Квинке при приеме НПВП (аспирина и/или анальгина и/или диклофенака) в любой лекарственной форме. Критерии исключения: проявления острой или обострение хронической инфекции, прием антигистаминных препаратов, системных глюкокортикостероидов, НПВП за 2 недели и менее до исследования. Контрольная группа здоровых доноров включала 45 чел., не имеющих непереносимости НПВП и не принимавших указанные препараты в течение 2 нед. до исследования. Клиническое исследование одобрено Межвузовским Комитетом по этике, протокол №05-12 от 17.05.2012 г.

Непосредственно перед проведением исследования производили подсчет лейкоцитарной формулы суспензии полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПМЛ) с определением их количества и жизнеспособности. Для анализа использовали гепаринизированную венозную кровь объемом 1,0 мл (концентрация гепарина 50 ЕД/мл). Из образцов крови отбирали объемы, содержащие  $1 \times 10^6$  лейкоцитов, и доводили их до 0,69 мл средой Хенкса. К полученным образцам добавляли 0,01 мл раствора салицилата натрия, метамизола натрия или диклофенака натрия в различных концентрациях. Конечные концентрации салицилата натрия составляли от 0,06 до 12 мМ, метамизола натрия — от 0,6 до 600 мкМ, диклофенака натрия — от 0,6 до 300 мкМ. Салицилат натрия (порошок, Екатеринбургская фарм. фабрика, Россия) и метамизол натрия (порошок, Медокеми Лтд, Кипр) растворяли в физиологическом растворе, диклофенак натрия (порошок, Фармстандарт, Россия) — в воде для инъекций. В контрольные пробы вместо используемых препаратов добавляли физиологический раствор или воду для инъекций в том же объеме. Каждую пробу инкубировали в течение 45 мин при 37°C при постоянном перемешивании. Жизнеспособность ПМЛ, определяемая окрашиванием трипановым синим, за время инкубации существенно не изменялась. После инкубации проводили измерение интенсивности хемилюминесценции (ХЛ) проб на 36-кюветном биохемилюминесцентном анализаторе БЛМ 3606-01



(г.Красноярск), сигнал от которого поступал на персональный компьютер и анализировался с помощью программы VLM-Obraб. В качестве активатора свечения использовали люминол (регистрирует суммарную продукцию активных форм кислорода) [7]. В кювету хемилюминометра вносили 0,7 мл пробы после инкубации и 0,15 мл активатора (2мМ). Далее измеряли уровень спонтанной ХЛ. После регистрации спонтанной ХЛ добавляли 0,15 мл стимулятора свечения — сульфата бария (2 мг/мл) и регистрировали уровень стимулированной ХЛ. Измерение ХЛ крови проводили в режиме постоянного перемешивания при температуре 37°С.

С помощью компьютерной программы VLM-Obraб определяли площадь под кривой ХЛ, отражающую светосумму ХЛ. При оценке влияния НПВП на ХЛ ПМЛ рассчитывали относительную светосумму свечения, как отношение светосумм свечения опытной и контрольной проб.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением программ «Statistica» версия 7.0 и Excel 2007. Соответствие закона распределения нормальному устанавливали с помощью  $\lambda$ -критерия Колмогорова—Смирнова. Статистическую достоверность отличия измеряемых величин определяли, используя критерий Манна—Уитни.

### Результаты и обсуждение

В табл. 1—3 показано влияние салицилата, метамизола и диклофенака натрия на СЛХЛ крови здоровых доноров и пациентов с непереносимостью аспирина и/или анальгина и/или диклофенака. Поскольку предварительные исследования не выявили существенных отличий в изменении СЛХЛ крови под влиянием салицилата натрия в группах пациентов с разными клиническими проявлениями непереносимости аспирина, мы объединили всех пациентов с различными клиническими проявлениями непереносимости аспирина в одну группу (табл. 1). Аналогичный результат был получен также в предварительных исследованиях по изучению влияния метамизола и диклофенака натрия на СЛХЛ крови пациентов с непереносимостью метамизола натрия и/или диклофенака натрия с разными клиническими проявлениями (табл. 2,3).

Как видно из данных табл. 1—3, используемые НПВП оказывают модифицирующее влияние на СЛХЛ крови здоровых доноров и больных с непереносимостью НПВП. У здоровых доноров малые концентрации препаратов стимулируют СЛХЛ крови, при увеличении концентрации развивается угнетение СЛХЛ. Дозозависимые изменения СЛХЛ крови выявляются и у пациентов с непереносимостью

НПВП. Общая закономерность выражается в снижении СЛХЛ при увеличении концентрации исследуемых НПВП. Практически при всех используемых концентрациях препаратов СЛХЛ больных с непереносимостью данных препаратов была значимо меньше, чем у здоровых доноров, и отсутствовала фаза стимуляции. Так, при концентрации салицилата натрия 3 мМ, метамизола натрия 30 мкМ, диклофенака натрия 75 мкМ развивалось существенное снижение СЛХЛ крови (примерно на 49%, 30%, 41% соответственно), в то время как у здоровых доноров при указанных концентрациях используемых НПВП относительная светосумма СЛХЛ существенно не отличалась от контроля и приблизительно была равна 1.

Следует отметить, что при отсутствии повышенной чувствительности к какому-либо из исследуемых НПВП (например, диклофенаку (табл. 3)) у больных с непереносимостью других НПВП (например, аспирина и/или анальгина), показатели относительной светосуммы СЛХЛ для диклофенака у этих больных не имели значимых отличий от таковых у здоровых доноров. Аналогичные результаты были получены по салицилату и метамизолу натрия (табл. 1,2).

Таким образом, нами выявлены статистически значимые различия показателей СЛХЛ крови у здоровых доноров и больных с непереносимостью НПВП после прединкубации проб крови с данными препаратами, что открывает возможность применения хемилюминесцентного теста для экспресс-диагностики непереносимости препаратов этой группы.

Мы считаем, что различия в показателях СЛХЛ цельной крови больных с непереносимостью НПВП по сравнению с донорами при прединкубации проб крови с НПВП связаны с влиянием на ферменты окислительного метаболизма находящихся в плазме крови биологически активных веществ (медиаторов), содержание и соотношение которых различно у доноров и больных с непереносимостью НПВП. В пользу этого предположения говорят ранее полученные нами данные, согласно которым, показатели стимулированной люминол- и люцигенинзависимой хемилюминесценции выделенных полиморфно-ядерных лейкоцитов под влиянием салицилата натрия, метамизола натрия, диклофенака натрия не имеют существенных отличий у доноров и больных с непереносимостью указанных препаратов, что может свидетельствовать об отсутствии каких-либо особенностей в работе ферментов окислительного метаболизма полиморфно-ядерных лейкоцитов под воздействием указанных НПВП у больных с непереносимостью данных препаратов по сравнению с донорами [8].

Данное предположение также хорошо соотносится с результатами экспериментальных и клинических ис-

## МЕТОДИКА

следований, доказывающих, что на фоне стимуляции аспирином *in vitro* увеличивается высвобождение сульфидолекотриенов лимфоцитами периферической крови у пациентов с непереносимостью аспирина, по сравнению с толерантными к указанному препарату лицами [3]. Кроме того, при непереносимости ацетилсалициловой кислоты аспирин провоцирует синтез и высвобождение лимфоцитами периферической крови 15-гидроксиэйкозатетраеновой кислоты *in vitro*, стимулирует высвобождение гистамина из тромбоци-

тов, базофилов, тучных клеток [4, 5]. Последнее подтверждается тем фактом, что у больных реакция на НПВП нередко сопровождается увеличением гистамина в плазме крови и его выведения с мочой [9]. Высказанное предположение об участии биологически активных веществ в подавлении СЛХЛ цельной крови под влиянием НПВП у больных с непереносимостью данных препаратов подтверждают также ранее полученные нами данные [10] об участии гистаминового механизма в подавлении СЛХЛ ПМЛ

Таблица 1

**Зависимость относительной светосуммы СЛХЛ крови от концентрации салицилата натрия у здоровых доноров и больных с непереносимостью НПВП (M ± m)**

| Концентрация салицилата натрия, мМ | Относительная светосумма СЛХЛ цельной крови |                                     |   |
|------------------------------------|---|-------------------------------------|---|
|                                    | Доноры                                      | Больные с непереносимостью аспирина | Больные с непереносимостью НПВП, толерантные к аспирину |
| 0,06                               | 1,32 ± 0,12*                                | 0,81 ± 0,08*#                       | 1,41 ± 0,07*  |
| 0,3                                | 1,42 ± 0,11*                                | 0,70 ± 0,06*#                       | 1,37 ± 0,11*  |
| 1,5                                | 1,32 ± 0,13*                                | 0,59 ± 0,05*#                       | 1,28 ± 0,11*  |
| 3                                  | 1,09 ± 0,09                                 | 0,51 ± 0,04*#                       | 1,07 ± 0,07   |
| 6                                  | 0,63 ± 0,05*                                | 0,41 ± 0,04*#                       | 0,67 ± 0,09*  |
| 12                                 | 0,28 ± 0,03*                                | 0,35 ± 0,03*                        | 0,35 ± 0,06*  |

Примечание. \* —  $p < 0,05$  относительно контроля; # —  $p < 0,05$  относительно аналогичной точки у здоровых доноров

Таблица 2

**Зависимость относительной светосуммы СЛХЛ крови от концентрации метамизола натрия (анальгина) у здоровых доноров и больных с непереносимостью НПВП (M ± m)**

| Концентрация метамизола натрия, мкМ | Относительная светосумма СЛХЛ цельной крови |                                      |  |
|-------------------------------------|---|--------------------------------------|--|
|                                     | Доноры                                      | Больные с непереносимостью анальгина | Больные с непереносимостью НПВП, толерантные к анальгину |
| 0,6                                 | 1,16 ± 0,07*                                | 0,72 ± 0,09*#                        | 1,15 ± 0,06*   |
| 6                                   | 1,17 ± 0,08*                                | 0,73 ± 0,06*#                        | 1,20 ± 0,06*   |
| 30                                  | 1,12 ± 0,12                                 | 0,70 ± 0,05*#                        | 1,01 ± 0,02  |
| 150                                 | 0,64 ± 0,07*                                | 0,47 ± 0,04*#                        | 0,70 ± 0,07*   |
| 300                                 | 0,46 ± 0,03*                                | 0,37 ± 0,07*                         | 0,51 ± 0,06*   |
| 600                                 | 0,26 ± 0,03*                                | 0,29 ± 0,05*                         | 0,36 ± 0,03*   |

Примечание. \* —  $p < 0,05$  относительно контроля; # —  $p < 0,05$  относительно аналогичной точки у здоровых доноров

Таблица 3

**Зависимость относительной светосуммы СЛХЛ крови от концентрации диклофенака натрия у здоровых доноров и больных с непереносимостью НПВП (M ± m)**

| Концентрация диклофенака натрия, мкМ | Относительная светосумма СЛХЛ цельной крови |   |   |
|--------------------------------------|---|---|---|
|                                      | Доноры                                      | Больные с непереносимостью диклофенака натрия | Больные с непереносимостью НПВП, толерантные к диклофенаку натрия |
| 0,6                                  | 1,67 ± 0,18*                                | 0,89 ± 0,10#                                  | 1,74 ± 0,13*  |
| 6                                    | 1,78 ± 0,17*                                | 0,92 ± 0,06#                                  | 1,77 ± 0,12*  |
| 30                                   | 1,37 ± 0,16*                                | 0,80 ± 0,08*#                                 | 1,34 ± 0,18   |
| 75                                   | 1,08 ± 0,08                                 | 0,59 ± 0,07*#                                 | 0,89 ± 0,08*  |
| 150                                  | 0,75 ± 0,07*                                | 0,42 ± 0,04*#                                 | 0,59 ± 0,06*  |
| 300                                  | 0,46 ± 0,06*                                | 0,29 ± 0,03*#                                 | 0,33 ± 0,03*  |

Примечание. \* —  $p < 0,05$  относительно контроля; # —  $p < 0,05$  относительно аналогичной точки у здоровых доноров

крови больных с непереносимостью аспирина и/или анальгина при инкубации проб крови с салицилатом натрия или анальгином. По-видимому, биологически активные вещества, воздействуя на ПМЛ, способны изменять активность ферментов окислительного метаболизма ПМЛ и, следовательно, модифицировать СЛХЛ крови. В частности, при изучении влияния гистамина, используемого в различных концентрациях, на окислительный метаболизм ПМЛ было выявлено, что гистамин дозозависимо изменяет активность НАДФН-оксидазной и миелопероксидазной ферментных систем ПМЛ [11].

Таким образом, выявлены существенные различия между показателями стимулированной сульфатом бария люминол-зависимой хемилюминесценции крови здоровых доноров и пациентов с непереносимостью аспирина и/или анальгина и/или диклофенака после прединкубации проб крови с соответствующим НПВП, что открывает возможность применения хемилюминесцентного теста для диагностики непереносимости данных препаратов.

### Список литературы

1. Гушин И.С. Эволюционное предупреждение: аллергия. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2014;1: 57-67.
2. Теблоева Л.М., Гуревич К.Г. Остеоиммунология и пародонтит. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2014; 3:67-72.
3. Kim MS, Cho YJ. Flow Cytometry-Assisted Basophil Activation Test as a Safe Diagnostic Tool for Aspirin/NSAID Hypersensitivity. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2012;4(3): 137-42.
4. Kowalski ML, Ptasinska A, Jedrzejczak M et al. Aspirin-triggered 15-HETE generation in peripheral blood leukocytes is a specific and sensitive Aspirin-Sensitive Patients Identification Test (aspitest). *Allergy*. 2005; 60(9):1139-45.
5. Kowalski M.L., Makowska J.S. Аспирин-зависимые заболевания органов дыхания. Современные подходы к диагностике и лечению. *Allergy Clin. Immunol. Int. J. World Allergy Org. Russ. Ed*. 2007; 2(1):12-22.
6. Пыцкий В.И., Сюсюкин Ю.П., Филатов О.Ю., Шерстнев М.П.. Способ выявления сенсibilизации организма при аллергических заболеваниях. Авторское свидетельство №1436643. Приоритет 13.12.85. Зарегистрир. 8.07.88.
7. Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция. *Успехи биологической химии*. 2009; Т. 49:341-88.
8. Чаусова С.В., Гуревич К.Г., Усанова Е.А. и др. Влияние нестероидных противовоспалительных препаратов на хемилюминесценцию полиморфно-ядерных лейкоцитов у пациентов с непереносимостью данных препаратов. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2014;77(5):28-31.
9. Пыцкий В.И., Адрианова Н.В., Артомасова А.В. Аллергические заболевания / под ред. В.И. Пыцкого М.: Издательство «Триада-Х», 1999; 470с.
10. Pytsky V.I., Filatov O.Ju., Chausova S.V. Role of histamine in inhibition of stimulated luminol-depended chemiluminescence of blood leucocytes induced by salicylate sodium or metamizole sodium (analgin) in aspirin or/and analgin sensitive patients. *Eur.J. of Clin. Che. & Clin. Biochem*. 1997;35(9):94.
11. Искусных А.Ю., Башарина О.В., Артюхов В.Г., Алабовский В.В. Влияние гистамина на функциональные свойства нейтрофилов и интенсивность процесса пероксидного окисления нейтрофилов в крови доноров. *Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2008;1:93-6.

### References

1. Gushchin I.S. Evolutionary admonition: allergy. *Patol. Fiziol. Eksp. Ter*. 2014; (1): 57-67. (in Russian)
2. Tebloeva L.M., Gurevich K.G. Osteoimmunology and parodontitis. *Patol. Fiziol. Eksp. Ter*. 2014; (3): 67-72. (in Russian)
3. Kim MS, Cho YJ. Flow Cytometry-Assisted Basophil Activation Test as a Safe Diagnostic Tool for Aspirin/NSAID Hypersensitivity. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2012; 4(3): 137-42.
4. Kowalski ML, Ptasinska A, Jedrzejczak M et al. Aspirin-triggered 15-HETE generation in peripheral blood leukocytes is a specific and sensitive Aspirin-Sensitive Patients Identification Test (aspitest). *Allergy*. 2005; 60 (9): 1139-45.
5. Kowalski M.L., Makowska J.S. Aspirin-sensitive respiratory diseases. New approaches to diagnosis and treatment. *Allergy Clin. Immunol. Int. J. World Allergy Org. Russ. Ed*. 2007; 2(1): 12-22.
6. Pytsky V.I., Susukin Ju.P., Filatov O.Ju., Sherstnev M.P. Method of detecting sensibilization in allergic diseases. Авторское свидетельство №1436643. Приоритет 13.12.85. Зарегистрирован 8.07.88.
7. Vladimirov Ju.A., Proskurina E.V. Free radicals and cellular chemiluminescence. *Uspekhi biologicheskoy khimii*. 2009; 49: 341-88. (in Russian)
8. Chausova S.V., Gurevich K.G., Usanova E.A. The effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes in patients with intolerance to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Eksp. Klin. Farm*. 2014; 77 (5): 28-31. (in Russian)
9. Pytsky V.I., Adrianova N.V., Artomasova A.V. Allergic diseases / pod red. V.I. Pytskogo — M: Izdatel'stvo «Triada-X», 1999. 470 p. (in Russian)
10. Pytsky V.I., Filatov O.Ju., Chausova S.V. Role of histamine in inhibition of stimulated luminol-depended chemiluminescence of blood leucocytes induced by salicylate sodium or metamizole sodium (analgin) in aspirin or/and analgin sensitive patients. *Eur.J. of Clin. Che. & Clin. Biochem*. 1997; 35 (9): 94.
11. Iskusnykh A.Ju., Basharina O.V., Artukhov V.G., Alabovskij V.V. The effect of histamine on the functional properties of neutrophils and the intensity of the peroxide oxidation process of neutrophils in blood donors. *Vestnik VGU, Serija: Khimija. Biologija. Farmacija*. 2008; (1): 93-6. (in Russian)

Поступила 29.10.14  
Received 29.10.14

**Сведения об авторах:**

*Гуревич Константин Георгиевич* — д. мед. наук, профессор, зав. кафедрой ЮНЕСКО «Здоровый образ жизни — залог успешного развития» Московского государственного медико-стоматологического университета. 103473, Москва, ул. Делегатская, д. 20/1. Тел.: 8-926-521-86-12, E-mail: kigurevich@mail.ru

*Бондарева Галина Петровна* — ведущий научный сотрудник ФГБУ ГНЦ «Институт Иммунологии ФМБА России», отделение «Бронхиальная астма», доктор медицинских наук. Москва, Каширское ш., д.24, корп.2. Тел.: (499) 618-25-26, 8-916-331-15-36, E-mail: bondarev-galina@yandex.ru

*Филатов Олег Юрьевич* — д.мед.наук, профессор кафедры патологической физиологии лечебного факультета Московского государственного медико-стоматологического университета. 105275, Москва, ул. Бориса Жигуленкова, 23/1. Тел.: 8-903-137-30-32; E-mail: helge@bk.ru

*Мальшиев Игорь Юрьевич* — зав. лаб. «Механизмов адаптации», д.мед.наук, проф.; зав. каф. патологической физиологии лечебного факультета Московского государственного медико-стоматологического университета, 105275, Москва, ул. Бориса Жигуленкова, 23/1. Тел.: 8-985-177-90-70; E-mail: Iymalyshev1@mail.ru

Шойбонов Б.Б.<sup>1</sup>, Кравченко М.А.<sup>2</sup>, Баронец В.Ю.<sup>3</sup>, Толпыго С.М.<sup>1</sup>, Костырева М.В.<sup>2</sup>,  
Шабалина А.А.<sup>2</sup>, Замолодчикова Т.С.<sup>1</sup>, Котов А.В.<sup>1</sup>, Панченко Л.Ф.<sup>3,4</sup>

## **Определение атерогенности иммунных комплексов, содержащих модифицированные липопротеины, в тесте связывания комплемента**

<sup>1</sup> — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина», 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

<sup>2</sup> — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр неврологии», 125367, Москва, Волоколамское ш., 80

<sup>3</sup> — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный научный центр наркологии» Минздрава России, 119002, Москва, М. Могилевский пер., 3

<sup>4</sup> — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

*Разработан способ определения атерогенности иммунных комплексов, содержащих множественно модифицированные липопротеины низкой плотности (ммЛПНП) в тесте связывания комплемента. В предлагаемом способе преципитат иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП (ИК-ммЛПНП), готовили из сыворотки крови человека путем обработки её буфером (8,3%-ный ПЭГ 3350 и 3,3%-ный ПВП 12600 в соотношении 1:1,2) в течение 10 мин при 23°C. Агрегаты ИК-ммЛПНП отделяли центрифугированием при 3100g в течение 10 мин при 23°C. Преципитат ИК-ммЛПНП растворяли в буфере без ПЭГ и ПВП, определяли в нем содержание холестерина и степень связывания комплемента морской свинки. Атерогенность ИК-ммЛПНП выражали как отношение степени связывания комплемента к холестерину в иммунных комплексах.*

**Ключевые слова:** атеросклероз, иммунные комплексы, содержащие ммЛПНП, холестерин в иммунных комплексах, степень связывания комплемента, атерогенность иммунных комплексов

Shoibonov B.B.<sup>1</sup>, Kravchenko M.A.<sup>2</sup>, Baronets V.Y.<sup>3</sup>, Tolpygo S.M.<sup>1</sup>, Kostyreva M.V.<sup>2</sup>,  
Shabalina A.A.<sup>2</sup>, Zamolodchikova T.S.<sup>1</sup>, Kotov A.V.<sup>1</sup>, Panchenko L.F.<sup>3,4</sup>

## **Estimation of atherogenic immune complexes containing modified lipoproteins in complement fixation tests**

<sup>1</sup> — Federal State Institution «Scientific-Research Institute of Normal Physiology named after P.K. Anokhin», Baltiyskaya st., 8, Moscow, 125315

<sup>2</sup> — Center Research of Neurology, 80, Volokolamskoye shosse, Moscow, 123367

<sup>3</sup> — Federal State Institution «The National Research Center of Addictions» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 3, Mogilcevskyy pereulok, Moscow, 119002

<sup>4</sup> — Federal State Institution «Scientific Research Institute of General Pathology and Pathophysiology», Baltiyskaya st., 8, Moscow, 125315

*A method for determining atherogenicity of the immune complexes containing multiple modified low-density lipoprotein (mmLDL) in complement fixation test has been found. In the proposed method, the precipitate immune complexes containing mmLDL (IC mmLDL) was prepared from human serum by treating it with buffer (8.3% of th PEG 3350 and 3.3% PVP 12600 th in the ratio 1: 1.2) for 10 min at 23°C. IC mmLDL aggregates were separated by centrifugation at 3100g for 10 min at 23°C. The precipitate IC mmLDL was dissolved in buffer without PEG and PVP, cholesterol content and the degree of binding of guinea pig complement were measured. Atherogenicity of the IC mmLDL was registered as the ratio of the degree of complement binding to cholesterol in the the immune complexes.*

**Key words:** atherosclerosis, immune complexes containing mmLDL, cholesterol in immune complexes, extent of binding of the complement, immune complexes atherogenicity

**Для корреспонденции:** Шойбонов Батожаб Батожаргалович, к.х.н., вед. науч. сотр. лаб. физиологии мотивации «НИИ нормальной физиологии им. П.К.Анохина», e-mail: shoibonov@mail.ru

Атеросклероз является ведущей причиной инвалидизации и смертности от сердечно-сосудистых заболеваний во всех развитых странах [1]. Образование атеросклеротической бляшки инициируется накоплением липопротеинов, в первую очередь липопротеи-

нов низкой плотности (ЛПНП), во внеклеточном матриксе субэндотелиального слоя сосудистой стенки. Частицы ЛПНП агрегируют, подвергаются окислительной, ферментативной и другим видам модификаций, в том числе липидной перекисидации и превращаются в атерогенные, множественно модифицированные ЛПНП (ммЛПНП), вызывающие аутоиммунную реакцию [2] и активацию системы комплемента [3]. Аутоантитела к модифицированным окислением липопротеинам низкой плотности (окЛПНП) были выявлены в сыворотке крови как больных ССЗ, так и здоровых людей [4, 5]. Наличие окЛПНП не всегда сопровождается развитием атеросклеротических изменений в ССЗ. Например, в экспериментах с иммунизацией животных окисленными *in vitro* ЛПНП только в 50% наблюдается экспериментальный атеросклероз [6]. Это может быть связано с тем, что в ряде случаев иммунная система имеет свойства позволяющие нейтрализовать окЛПНП.

*Цель работы* — определение атерогенности иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП, в тесте связывания комплемента.

### Методика

В работе исследовали сыворотки крови 26 доноров и 26 неврологических больных. Забор крови осуществляли из локтевой вены после 14-часового голодания. Содержание холестерина (ХС), триацилглицеридов (ТАГ) и общего белка в сыворотке крови определяли с помощью реактивов ЗАО «ЭКОлаб» (г.Электрoгорск, Россия). В работе использовали веронал, мединал, — фирмы «Seriva» (ФРГ), трис — «Merck» (ФРГ), полиэтиленгликоль 3350 «Sigma» (США), поливинилпирролидон 12600 ± 2700 «Синтвита» (Россия), компонент морской свинки, консервированные эритроциты барана — ЗАО «ЭКОлаб» (г.Электрoгорск, Россия), остальные реактивы квалификации не ниже ч.д.а. отечественного производства.

Приготовление эритроцитов барана эритроцитов барана сенсibilизированных антителами кролика (ЭБ-А), вероналового буфера, рН 7,4 (ВБ), буфера, содержащего ионы  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  ( $VCB^{2+}$ ), описано ранее [7]. Состав буфера для агрегации ИК (Буфер-1): 8,3% ПЭГ-3350 и 3,3% ПВП 12600 в 0,01 М Трис-НСl-буфере, содержащем 0,15 М NaCl, 0,02%  $NaN_3$ , рН 7,4. Состав буфера для растворения ЦИК (Буфер-2): 0,01М трис-НСl-буфер, содержащий 0,15М NaCl, 0,02%  $NaN_3$ , рН 7,4.

Для оценки состояния стенки сонных артерий (СА) использовали ультрасонографию высокого разрешения в В-режиме с применением линейного сосудистого датчика с частотой 7,5 МГц на ультразвуковом сканере «SonoScare SSI-1000» (Китай). Прото-

кол обследования включал сканирование левой и правой общих СА (ОСА) с фокусировкой на задней стенке артерии в трех фиксированных проекциях — передне-боковой, боковой и задне-боковой. Измерение толщины интима-медиа (ТИМ) осуществляли на участке ОСА длиной 10 мм, противоположащем началу каротидного синуса. ТИМ задней стенки ОСА определяли как расстояние от ведущего края первой эхогенной зоны до ведущего края второй эхогенной зоны. Среднее значение трех измерений рассматривали как интегральный показатель ТИМ.

### Этапы исследования

1. Подбор оптимальной концентрации ПВП-12600 (при постоянной концентрации 4,5% ПЭГ-3350) для осаждения иммунных комплексов, содержащих множественно модифицированные ЛПНП (ммЛПНП) из пулированной сыворотки крови здоровых доноров

К 50 мкл пулированной сыворотки крови здоровых доноров добавляли по 50 мкл 10% ПЭГ-3350 и от 10 до 40 мкл раствора 20% ПВП (молекулярная масса  $12600 \pm 2700$ ), тщательно перемешивали и инкубировали 10 мин при 23°C. Контрольная проба содержала только 5% ПЭГ-3350 и 50% пулированную сыворотку крови человека. Образовавшиеся агрегаты иммунных комплексов осаждали центрифугированием при 3100g в течение 10 мин при 23°C. Супернатант тщательно декантировали, и преципитат растворяли в 50 мкл буфера-2.

2. Определение холестерина и общего белка в ПЭГ/ПВП-преципитатах, приготовленных при разных концентрациях ПВП-12600 и постоянной концентрации 4,5% ПЭГ-3350

В преципитатах после растворения в 50 мкл буфера-2 определяли содержание холестерина и общего белка с использованием наборов реагентов фирмы «ЗАО Эколаб» (Россия). Общий белок в преципитате представлял собой циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК), содержащие в качестве антигена как ммЛПНП, так и другие антигены. Полученные результаты представлены в табл. 1.

3. Определение степени связывания комплемента морской свинки циркулирующими иммунными комплексами в преципитатах, приготовленных при возрастающих концентрациях ПВП и постоянной концентрации 4,5% ПЭГ-3350

К 10 мкл растворов ПЭГ/ПВП-преципитатов, разбавленных в соотношении 1:99 буфером  $VCB^{2+}$ , добавляли 20 мкл, разбавленного 1:19 комплемента морской свинки. Общий объем доводили до 0,3 мл

буфером ВСБ<sup>2+</sup> и инкубировали 20 мин при 37°C. После инкубации добавляли 200 мкл ЭБ-А и повторно инкубировали 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 2,5 мл холодного раствора 0,15М NaCl, центрифугировали и оценивали степень лизиса эритроцитов по выходу гемоглобина в супернатант. Контрольная проба не содержала преципитата иммунных комплексов. Снижение гемолиза в опытных пробах по сравнению с контролем свидетельствовало о связывании комплемента.

Степень лизиса эритроцитов (У) определяли по формуле:

$$Y(\%) = [(X - R) / (H - R) \times 100],$$

где H, R и X — величины оптической плотности A<sub>405</sub> в гемолитических системах контрольной пробы, в контроле спонтанного лизиса ЭБ-А и в опытной пробе соответственно.

Степень связывания комплемента (ССК) определяли по формуле:

$$ССК(\%) = 100 - Y.$$

Полученные результаты представлены в табл. 1.

#### Определение содержания IgG в преципитатах

*Приготовление эритроцитов барана, сенсibilизированных гетерофильными антителами человека.* Предварительно определяли титр гетерофильных антител в сыворотке крови человека. Использовали инактивированную прогреванием при 56°C в течение 20 мин сыворотку крови человека с титром гетерофильных антител 1:512 для получения иммунного комплекса. Для этого эритроциты барана сенсibilизировали антителами человека (ЭБ-А<sub>ч</sub>) в субагглютинирующей дозе, 1:1024). После 30 мин инкубации сформированный комплекс EA<sub>ч</sub> отделяли центрифугированием, осадок при центрифугировании 3 раза промывали 0,15 М раствором NaCl и готовили 1% взвесь EA<sub>ч</sub>.

*Определение титра антител барана к IgG человека с использованием приготовленного иммунного комплекса (EA<sub>ч</sub>).* Предварительно титровали препарат антител барана в 96-луночных круглодонных иммунологических плашках, добавляли равный

объем 1% суспензии EA<sub>ч</sub>, тщательно перемешивали и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После инкубации определяли конечное разведение антител барана, при котором наблюдалась полная гемагглютинация.

*Проведение реакции торможения гемагглютинации (РТГА).* Предварительно титровали прогрессивным разведением преципитаты иммунных комплексов, разведенных 1:99, в круглодонных иммунологических плашках. В качестве стандарта использовали препарат IgG с исходной концентрацией 1 мг/мл. После титрования преципитатов и стандартного препарата IgG добавляли равный объем разбавленного раствора поликлональных антител барана против IgG человека, содержащего 4 гемагглютинирующие единицы. Тщательно перемешивали и добавляли равный объем 1% суспензии иммунных комплексов (EA<sub>ч</sub>), повторно перемешивали и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После инкубации определяли для каждой пробы лунку, где наблюдалось торможение гемагглютинации. Расчеты проводили с использованием данных по торможению гемагглютинации стандартного препарата IgG человека. Полученные данные представлены в табл. 1.

Из данных, представленных в табл. 1, следует, что при концентрации 4,5% ПЭГ-3350 в сыворотке наблюдается агрегация иммунных комплексов, содержащих множественно модифицированные липопротеины (ммЛПНП). Показателем агрегации как иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП, так и нативных ЛПНП, является содержание холестерина в преципитатах. Добавление ПВП-12600 в раствор сыворотки, содержащей 4,5% ПЭГ-3350, вызывает агрегацию иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП от 0,3% до 1,8%. Дальнейшее увеличение концентрации ПВП-12600 выше 1,8% в системе приводит к агрегации и преципитации нативных ЛПНП. Об этом свидетельствует отсутствие возрастания степени связывания комплемента преципитатами, полученными при концентрации ПВП-12600 свыше 1,8%. Сохранение степени связывания комплемента на уровне 65-68% и возрастание концентрации холестерина и общего белка в преципитатах при увеличении концентрации ПВП-12600

Таблица 1

Содержание холестерина, общего белка, IgG в преципитатах и степень связывания комплемента (ССК) иммунными комплексами, приготовленными из пулированной сыворотки крови доноров, в зависимости от концентрации ПВП-12600 при постоянной концентрации 4,5% ПЭГ-3350

|                           |      |      |      |       |      |      |      |      |      |      |     |
|---------------------------|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|------|-----|
| Концентрация ПВП-12600, % | 0,3  | 0,7  | 1,0  | 1,3   | 1,8  | 2,0  | 2,3  | 2,7  | 3,0  | 3,3  | 0   |
| Холестерин, мг/дл         | 1,1  | 1,3  | 2,0  | 5,3   | 7,1  | 8,5  | 10,2 | 15,7 | 20,4 | 24,2 | 0   |
| IgG мг/мл                 | 0,06 | 0,06 | 0,12 | 0,120 | 0,24 | 0,24 | 0,24 | 0,24 | 0,24 | 0,24 | 0   |
| Общий белок, мг/мл        | 0,5  | 0,62 | 0,74 | 0,82  | 0,97 | 1,2  | 1,4  | 1,62 | 1,88 | 2,1  | 0,3 |
| ССК, %                    | 7    | 14   | 26   | 50    | 65   | 64   | 66   | 63   | 68   | 67   | 0   |

(более 1,8%) свидетельствует, с одной стороны, о полной агрегации иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП, с другой стороны, об агрегации нативных ЛПНП, которые не обладают комплемент связывающей способностью. Возрастание уровня общего белка также подтверждает агрегацию и преципитацию нативных ЛПНП. Наличие IgG в преципитатах, приготовленных в присутствии ПВП, свидетельствует об иммунных комплексах, содержащих ммЛПНП, тогда как постоянный уровень IgG в преципитатах, полученных при концентрации ПВП 1,8% и выше, свидетельствует о специфической преципитации иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП.

Таким образом, при постоянной концентрации ПЭГ 3350 (4,5%) и концентрациях ПВП-12600 в диапазоне от 0,3% до 1,8% наблюдается избирательная агрегация и преципитация иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП, и не наблюдается агрегация и преципитация как нативных ЛПНП, так и свободных IgG.

**Определение содержания холестерина в иммунных комплексах в сыворотке крови доноров и больных с атеросклерозом брахиоцефальных артерий**

Приготовление преципитата сыворотки крови при 1,8% ПВП-12600 и 4,5% ПЭГ-3350. К 50 мкл сыворотки крови неврологических больных и относительно здоровых доноров добавляли по 60 мкл буфера-1 и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Образовавшиеся агрегаты иммунных комплексов осаждали центрифугированием строго при 23°C в течение 10 мин при 3100g. Супернатант тщательно декантировали и

осадок растворяли в 50 мкл буфера-2. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Как видно из данных, представленных в табл. 2, в группе относительно здоровых доноров в трех пробах содержание ХИК было заметно выше, чем в остальных пробах этой контрольной группы. Полученные данные о повышенном уровне ХИК у трех доноров, возможно, свидетельствуют о субклиническом атеросклерозе у данных лиц. При исключении данных доноров из группы контроля по ХИК, средний уровень ХИК составляет  $7,07 \pm 1,15$ , при колебании от 5,9 до 8,3 мг/дл. В группе больных в 100% случаев определяется повышенный уровень иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП, и колебания составили от 11,7 до 40,3 мг/дл.

*Определение степени связывания комплемента морской свинки иммунными комплексами, содержащими ммЛПНП.* К 10 мкл растворов преципитатов, разбавленных 1:99 буфером ВСБ<sup>2+</sup>, добавляли 12 мкл разбавленного 1:19 буфером комплемента морской свинки. Общий объем доводили до 0,3 мл буфером ВСБ<sup>2+</sup> и инкубировали 20 мин при 37°C. После этого добавляли 200 мкл ЭБ-А<sub>кр</sub> и продолжали инкубацию в течение 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 2,5 мл холодного раствора 0,15М NaCl, центрифугировали и определяли величину лизиса эритроцитов по выходу гемоглобина в супернатант. Контрольная проба не содержала преципитата иммунных комплексов. Пониженный гемолиз в опытных пробах по сравнению с контролем сви-

Таблица 2

Содержание холестерина в иммунных комплексах (ХИК) в сыворотке крови доноров и неврологических больных

| Доноры | ХИК, мг/дл  | Больные | ХИК, мг/дл   |
|--------|-------------|---------|--------------|
| 1      | 5,2         | 1       | 12,6         |
| 2      | 7,4         | 2       | 14,2         |
| 3      | 6,8         | 3       | 11,7         |
| 4      | 6,5         | 4       | 17,4         |
| 5      | 7,8         | 5       | 22,3         |
| 6      | 8,2         | 6       | 14,8         |
| 7      | 6,8         | 7       | 16,3         |
| 8      | 17,8        | 8       | 13,7         |
| 9      | 9,2         | 9       | 13,4         |
| 10     | 6,7         | 10      | 12,2         |
| 11     | 15,3        | 11      | 24,8         |
| 12     | 8,3         | 12      | 40,3         |
| 13     | 17,5        | 13      | 16,5         |
| 14     | 5,9         | 14      | 22,4         |
| 15     | 6           | 15      | 18,2         |
| M ± m  | 9,03 ± 4,21 | M ± m   | 18,05 ± 7,34 |



Содержание холестерина иммунных комплексов (ХИК), степень связывания комплемента (ССК) и атерогенность иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП (АИК-ммЛПНП) в ПЭГ/ПВП-преципитатах сывороток крови доноров и неврологических больных

| Доноры | ХИК, мг/дл | ССК, %  | АИК-ммЛПНП | Больные | ХИК, мг/дл  | ССК, %  | АИК-ммЛПНП |
|--------|------------|---------|------------|---------|-------------|---------|------------|
| 1      | 5,2        | 56      | 108        | 1       | 16,6        | 43      | 2,6        |
| 2      | 6,4        | 70      | 109        | 2       | 15,6        | 52      | 3,3        |
| 3      | 2,3        | 27      | 117        | 3       | 33,4        | 74      | 2,2        |
| 4      | 4,5        | 80      | 178        | 4       | 13,8        | 18      | 3,5        |
| 5      | 9,2        | 78      | 85         | 5       | 44,5        | 8       | 0,2        |
| 6      | 5          | 41      | 82         | 6       | 67,5        | 22      | 0,3        |
| 7      | 5,3        | 53      | 100        | 7       | 34,2        | 19      | 0,6        |
| 8      | 5,7        | 82      | 144        | 8       | 17,5        | 45      | 2,6        |
| 9      | 6,8        | 73      | 107        | 9       | 27,7        | 89      | 3,2        |
| 10     | 7,8        | 69      | 89         | 10      | 24,9        | 78      | 3,1        |
| 11     | 8,4        | 49      | 58         | 11      | 18,6        | 74      | 4          |
| М ± m  | 6,1 ± 2,0  | 62 ± 18 | 107 ± 32   | М ± m   | 28,6 ± 16,1 | 47 ± 28 | 2,3 ± 1,4  |

детельствовал о связывании комплемента. Степень лизиса эритроцитов (У) определяли по формуле:

$$Y(\%) = [(X - R) / (H - R) \times 100],$$

где H, R и X — величины оптической плотности  $A_{405}$  в гемолитических системах контрольной пробы, в контроле спонтанного лизиса ЭБ-А<sub>кр</sub> и в опытной пробе соответственно.

Степень связывания комплемента (ССК) определяли по формуле:

$$ССК(\%) = 100 - Y.$$

Определение атерогенности иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП, в тесте связывания комплемента рассчитывали как отношение степени связывания комплемента к холестерину преципитированных иммунных комплексов в индивидуальных сыворотках. Полученные результаты представлены в табл. 3.

Как видно из данных, представленных в табл. 3, содержание холестерина в иммунных комплексах в сыворотке крови здоровых доноров в 100% случаев было ниже 10 мг/дл (разброс от 2,3 до 9,2 мг/дл), в то время как в сыворотке крови неврологических больных, с инструментально подтвержденным атеросклерозом каротидных артерий, ХИК был в среднем в 4,7 раза выше нормальных величин и варьировал от 13,8 до 67,5 мг/дл. Степень связывания комплемента морской свинки ПЭГ-преципитатом в группе здоровых доноров была значительно выше, чем в группе больных (в среднем 62% и 47% соответственно).

Полученные результаты по оценке атерогенности иммунных комплексов в тесте связывания комплемента свидетельствуют о том, что иммунные комплексы больных с атеросклерозом каротидных артерий обладают сниженной комплемент-активирующей, в данном случае гетерологичного комплемента морской свинки. И как

следствие — повышенный уровень иммунных комплексов, содержащих ммЛПНП, в крови у больных с атеросклерозом каротидных артерий, из-за нарушения их солюбилизации и элиминации с участием аутологичной системы комплемента. Сниженная комплемент-активирующая способность иммуноглобулинов в иммунных комплексах больных с атеросклерозом также приводит к незавершенному фагоцитозу и как следствие — образованию «пенистых» клеток при данной патологии.

### Список литературы

1. Braunwald E. Shattuck lecture — cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *N. Engl. J. Med.* 1997; 337: 1360-9.
2. Vaarala O. Antibodies to oxidised LDL. *Lupus.* 2000; 9: 202-5.
3. G.Szeplaki, L. Varga, G.Fust, Z.Prohaszka Role of complement in the pathomechanism of atherosclerotic vascular diseases. *Molecular Immunology.* 2009; 46: 2784-93.
4. Schumacher M., Eber B., Tatzber F., Kaufmann P., Halwachs G., Fruhwald F.M. et al. Transient reduction of autoantibodies against oxidized LDL in patients with acute myocardial infarction. *Free Radic. Biol. Med.* 1995; 18: 1087-91.
5. Uusitupa M.I., Nishanen L., Luoma J., Vilja P., Mercuri M., Rauramaa R. et al. Autoantibodies against oxidized LDL do not predict atherosclerotic vascular disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996; 16: 1236-42.
6. Palinski W., E Miller E., J L Witztum J.L. Immunization of Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor-Deficient Rabbits with Homologous Malondialdehyde-Modified LDL Reduces Atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995; 92: 821-5.
7. Shoibonov B.B., Osipov A.V., Kryukova E.V. Zinchenko A.A., Lakhtin V.M., Tsetlin V.I. et al. Oxiagin from the Naja oxiana cobra venom is the first reprolysin inhibiting the classical pathway of complement. *Mol. Immunol.* 2005; 42: 1141-53.

Поступила 29.10.14

Received 29.10.14

**Сведения об авторах:**

*Кравченко Михаил Андреевич*, ст. науч. сотр. лаб. эпидемиологии и профилактики заболеваний нервной системы «Научный центр неврологии»;

*Баронец Валерия Юрьевна*, ст. науч. сотр. лаб. биохимии ННЦ наркологии Минздрава России, 119002, Москва, Малый Могильцевский пер., 3;

*Толпыго Светлана Михайловна*, вед. науч. сотр. лаб. физиологии мотивации «НИИ нормальной физиологии им. П.К.Анохина»

*Костырева Марина Владимировна*, науч. сотр. лаб. биохимии «Научный центр неврологии», 125367, Москва, Волоколамское ш., 80;

*Шабалина Алла Анатольевна*, с.н.с., зав. лабораторией биохимии «Научный центр неврологии», 125367, Москва, Волоколамское ш., 80

*Замолодчикова Татьяна Степановна*, с.н.с. лаборатории физиологии мотивации «НИИ нормальной физиологии им. П.К.Анохина»

*Котов Александр Владимирович*, д.м.н., профессор, зав. лабораторией физиологии мотивации «НИИ нормальной физиологии им. П.К.Анохина»

*Панченко Леонид Федорович*, д.м.н., проф., акад. РАН, зав. лаб. молекулярных механизмов наркотической зависимости НИИ общей патологии и патофизиологии

© Пальцын А.А., 2014  
УДК 616-092

Пальцын А.А.

## Врач-философ — Донат Семенович Саркисов (к 90-летию со дня рождения)

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

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

*Огромный и стремительно увеличивающийся объем фактического материала современной биологии и медицины без его систематизации уже не развивает, а тормозит развитие науки. Науке как занятию, объясняющему окружающий мир необходимо внести строй в хаос фактов. Это можно сделать только на основе философии диалектического материализма, позволяющего объективно, реально упорядочить в теоретических обобщениях океан частных фактов. Гениальным материалистом диалектиком был Донат Семенович Саркисов, который согласовал главные положения общей патологии с современными биологическими науками, современной клинической практикой, материалистической диалектикой.*

**Ключевые слова:** *Донат Семенович Саркисов, общая патология, философия, диалектический материализм*

Paltsyn A.A.

## The physician-philosopher — Donat Semenovitch Sarkisov. To the 90 anniversary since birth

Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8, Baltiiskaya str., 125315, Moscow, Russia  
Russian medical academy of postdegree education, 2/1, Barrikadnaya st., 123836, Moscow, Russia

*The huge and promptly increasing volume of the actual material of modern biology and medicine without its systematization doesn't develop any more, and slows down development of science. The science as the work which are explaining world around needs to bring a system in chaos of the facts. This can be done only on the basis of the philosophy of dialectical materialism, which allows an objective, realistic to create theoretical generalizations of the ocean of particulars. Donat Semenovitch Sarkisov who agreed the main phenomena of the general pathology with modern biological sciences, modern clinical practice, materialistic dialectics was the genial philosopher.*

**Key words:** *Donat Semenovitch Sarkisov, general pathology, philosophy, dialectic materialism*

Донат Семенович всю жизнь называл себя патологоанатомом. Специальность эту он приобрел в Ленинграде, но называл себя «воспитанником классической московской патологоанатомической школы», поскольку его учитель С.С. Вайль — ученик А.И. Абрикосова. Донат Семенович был прекрасным патологоанатомом, искусным диагностом в аутопсийном и биопсийном исследовании. Он очень любил свою специальность, мечтал, доработав в президиуме РАМН до ближайших выборов, перейти полностью на работу в отдел патологической анатомии института хирургии им. А.В.Вишневского РАМН, которым он руководил с 1958 года. Отдавать всё время прозекторскому делу, исследованию биопсий и науке. Но, свой «нерукотворный памятник» он создал в области общей па-

тологии. В общей патологии его главный труд, сердце, любовь и подвиг.

Научно-технический прогресс последних 50—60 лет потребовал для приведения в стройную систему добытого с его помощью огромного фактического материала появления врача-философа, поскольку только философия способна свести бесчисленные и, казалось бы, разрозненные частные наблюдения, факты, закономерности — к немногим принципиальным положениям, чтобы врач был не запоминающей машиной, а думающим специалистом.

Таким врачом-философом, создавшим современную общую патологию, оказался Донат Семенович Саркисов. Он переосмыслил почти всю общую патологию, внес ясность и простоту истины во многие вопросы, привел общую патологию в соответствие со всем комплексом современных биологических и медицинских наук, с современной клинической практикой,

*Для корреспонденции:* Пальцын Александр Александрович, д.биол.н., профессор, зав. лабораторией регуляции репаративных процессов; ltp@mail.ru

с материалистической диалектикой, с эволюционной теорией. Общая патология как свод основных закономерностей возникновения, развития и исходов болезней человека оказалась в существенной мере обновленной и получившей мощный импульс для своего дальнейшего развития. Скажу лишь о некоторых постулатах теоретической и практической медицины, модернизированных или радикально измененных Д.С.

Строгое фактическое обоснование принципа единства структуры и функции, с одной стороны не вызывающего сомнений в философском плане, а с другой, до сих пор, по существу, игнорируемого в теоретической и, тем более, в практической медицине. [1]. Одним из доказательств принципа стало наблюдение, сделанное в отделе Д.С. на основе электронно-радиоавтографического изучения ультраструктурных изменений при различных режимах функциональной нагрузки на орган. Оказалось, что колебания функциональной активности клетки сопровождаются синхронно происходящими с ними изменениями внутриклеточных структур, начиная с самых элементарных — биологических макромолекул. Нанесение раны, например, вызывало повышение уровня синтеза информационной и рибосомной РНК, гиперплазию гранулярного эндоплазматического ретикулаума в фибробластах, что структурно обеспечивало усиление их функции — образование грануляционной ткани [2].

Будучи ограниченным объемом статьи, привожу лишь ничтожную часть фактических доказательств идей Д.С. или сообщаю их в декларативной форме, надеясь на обращение заинтересованного читателя к первоисточникам.

Создание теории регенерации — стержневого процесса жизнедеятельности в норме и патологии и главной медицинской проблемы [3]. Успех врачей всех специальностей, всех времен и всех народов определялся, определяется и всегда будет определяться тем, насколько их действия согласуются со сложившимися в эволюции естественными механизмами регенерации.

Строить теорию регенерации, как и все свои теории, Д.С. начал с начала, т.е. от основ мироздания. В природе нет ничего кроме материи и движения. Движущая сила живой материи — единство двух противоположных начал: разрушения и восстановления, распада и синтеза, диссимилиации и ассимиляции. Созидание во всех его формах и есть регенерация. Иными словами регенерация — одна из двух составляющих явления, которое мы называем — жизнь. Уже этот первичный посыл обнажает несостоятельность старой теории о снижении и утрате способности к регенерации с увеличением высоты положения животного на эволюционной лестнице, о хорошо и плохо регенерирующих органах. Как может у преуспеваю-

щего в эволюции или жизни вида или индивида или полноценно работающего органа утрачиваться один из двух неперенных атрибутов жизни? Всё, что живет — регенерирует, но по разному, как он выражался «соответственно своему структурно-функциональному своеобразию». По теории Д.С. Саркисова, регенерация не имеет той односторонне морфологической направленности, какую ей приписывали раньше. Регенерация выполняет в природе структурно-функциональную задачу, она обеспечивает функцию путем постоянного воссоздания выполняющих эту функцию структур. Вместо старой трактовки регенерации как явления связанного с болезнью, Д.С. доказывает примат физиологической регенерации, поддерживающей функцию, жизнь. И лишь в случае отклонения жизни от нормального хода патологическим процессом, возникает репаративная регенерация. Последняя развивается на базе физиологической, по тем же механизмам, выражается в тех же формах и имеет только количественные отличия от физиологической. Теория Д.С. высветила истинную форму явления регенерации, раскрыла её место и роль в живой природе, прояснила суть таких общепатологических процессов, как атрофия, дистрофия, гипертрофия. Зная своеобразие проявления регенерации в тех или иных органах, можно способствовать регенерации имеющимися терапевтическими средствами и теоретически осмысленно искать новые средства для перехода к той научно обоснованной идеальной форме лечения, которую мы называем этиологической. [4]

На этиологическое лечение направлен и разработанный Д.С. принцип апнтагонистической регуляции функций. Он показал, что этот принцип — частное проявление закона «единства и борьбы противоположностей» и с его помощью привел в единую систему как старые сведения о возбуждении и торможении в нервной системе, так и новые данные о клетках-антагонистах и веществах-антагонистах, трансформирующих всё разнообразие влияний среды в два конечных внутриклеточных эффекта: усиление и торможение функции. [5] Обращение Д.С. к этой теме обусловлено его ориентацией на клинику, которой приходится бороться с возрастающим числом расстройств регуляции.

Его учение о болезни оказалось разработкой в области медицины категории материалистической диалектики «материя и движение». Он доказал что деление болезней на функциональные и органические не только ошибочно в теоретическом отношении, но и вредно в практическом, т.к. является «питательной средой» для дальнейшего формирования контингента тяжелых, инкурабельных больных. По мере развертывания патологического процесса включаются компенсаторно-приспособительные реакции, которые ни-

велируют функциональные нарушения и «задерживают» их выход в клинику в виде симптомов и синдромов. В итоге получается, что каждая фаза болезни проявляется в виде клинико-функциональных признаков не по мере своего развития, а позже. «Запоздалость» клинических проявлений болезни приводит к тому, что клиницист часто имеет дело не с «первичными функциональными и вторичными морфологическими изменениями», а, наоборот, с вторичными функциональными изменениями, проявившимися только через некоторый период времени от момента действительного начала болезни в её морфологическом оформлении. Первые субъективные и объективные клинические проявления болезни часто являются сигналами не начала болезни, а фазы декомпенсации, когда защитные силы уже не могут скрыть происходящие в организме изменения. При выздоровлении интенсификация компенсаторно-приспособительных реакций приводит к тому, что восстановление самочувствия больного и многих клинических показателей его состояния «обгоняет» ход нормализации структуры измененных органов. Морфологическая реконвалесценция отстает от клинической. Поэтому можно говорить о двух бессимптомных периодах болезни — доклиническом и послеклиническом. Видимая клиницисту часть болезни значительно короче её действительной протяженности [4]

Легко заметить, один общий прием, которым Д.С. достигает того, что его работы по общей патологии отличаются простотой, правдой, красотой гармонии с современными данными других биологических наук и клинической практикой. Он определял место той или иной медицинской проблемы в диалектической картине мира и вел дальнейшую разработку медицинских вопросов строго с позиций диалектического материализма. Иными словами, использовал философию для познания и объяснения вопросов медицины, т.е. шел обычным путем ученого. Ученые, — те, которые делают открытия — все материалисты. Даже если они священники, как Коперник, Мендель, Дарвин или верующие, как Ньютон, Павлов. Однако, обдумывая проблемы общей патологии он шел от медицины к философии.

Размышляя о проблеме адаптации, Д.С. понял, что теория регенерации объясняет лишь одну сторону этой проблемы — количественную, т.е. механизмы обновления и гиперплазии числа структур, необходимого для выполнения определенной функции. Но механизмы адаптации сложнее. Нормальные и патогенные факторы среды разнообразны. Поэтому если бы на качественно различные факторы организм реагировал лишь стереотипной, только количественной, гиперпластической реакцией адаптация не была бы столь совершенной. Пересматривая существующие

способы изменения качества, он понял, что в биологических системах наиболее распространен, эффективен и важен способ рекомбинационных преобразований. Имеется в виду, что адаптивные и компенсаторные процессы могут осуществляться с помощью преобразований внутри уже существующих систем без увеличения числа составляющих их элементов. Это позволяет организму создавать быстрое, малозатратное (по количеству вещества и энергии) приспособление к действию нормального или патогенного фактора. Так, например, если взять самый распространенный патогенный он же нормальный фактор — гипоксию, то при его действии намного раньше увеличения числа эритроцитов в крови, т.е. количественной реакции, меняются соотношения скоростей транскрипции дыхательных ферментов в мышцах [6]. Иными словами, приспособление путем рекомбинации совершается раньше, чем приспособление путем гиперплазии.

Сегодня, когда открытие уже сделано, кажется невероятным, как философы веками объясняли появление нового качества, только путем изменения количества и не замечали очевидного, на каждом шагу встречающегося появления нового качества путем рекомбинации без изменения числа элементов системы. Еще одно свидетельство страшной власти мыслительных штампов. Появление нового качества путем комбинационных преобразований не только знакомо людям, но сознательно и очень широко используется уже тысячи лет. Строитель знает, что из одинакового числа кирпичей можно построить гараж, коровник, дом и церковь, т.е. получить качественно разный результат. Музыкант знает, что комбинациями звуков, полученных с помощью 85 клавиш фортепиано можно исполнить любую мелодию, — получить качественно разный результат. Крестьянин знает, что комбинируя последовательность культур, засеваемых на одном участке поля, можно менять урожайность этих культур, т.е. получить новое качество. Строителю, музыканту и крестьянину указанные комбинационные преобразования представляются не более, чем особенностями их профессии, а поиск связей между явлениями природы не входит в их профессиональные обязанности. Профессионалы, т.е. философы, обращались к этому вопросу, но трусливо. Баррикадами слов пытались скрыть боязнь признать, что закон перехода количества в качество объясняет не все случаи появления нового качества [7, 8]. Кант говорил: «Надо иметь мужество пользоваться своим умом». У философов мужества не хватило. Интересно другое. Комбинационными преобразованиями давно и успешно занимаются ученые. Среди них есть великие имена людей умных и смелых в использовании ума. Замечательный русский химик Александр Михайлович Бутлеров объяснил явление изомерии комбинаци-

онными преобразованиями, т.е. тем, что различие свойств молекул, имеющих одинаковое число атомов, обусловлено различным расположением атомов относительно друг друга [9]. Главнейший момент жизни — биологический код основан на комбинационных преобразованиях. К рекомбинациям биологического кода причастны многие замечательные ученые. Для формальной объективности назову только Нобелевских лауреатов и то не всех: Ф.Крик, С.Очоа, Х.Корана, А.Корнберг. С.Бреннер, У.Ниренберг [10]. Ещё пример комбинационного преобразования в биологии — способность создавать антитела практически к любому веществу. Рекомбинации ДНК — свойство половых клеток. Единственная соматическая клетка, в которой тоже происходит рекомбинация ДНК — лимфоцит [11]. Таким путем, имея всего 120 генов, предназначенных для программирования биосинтеза антител, организм может создать потенциально  $10^{16}$  разновидностей антител (фактически чуть меньше, но не потому, что нельзя создать такого числа комбинаций, а потому, что в организме просто нет такого числа лимфоцитов, каждый из которых может дать клон антитела одной специфичности). Феномен открыт Susumu Tonegawa — Нобелевским лауреатом 1987 года. Последний в моей череде примеров но, возможно, первый по таланту — знаменитый нейробиолог и патологоанатом, Нобелевский лауреат Сантьяго Кахаль (Sajal S.) писал: «интеллигентность, талант, гений — это не количество нейронов, а объём белого вещества» [12]. Белое вещество — это связи нейронов. Чем многочисленнее и сложнее связи, тем быстрее и разнообразнее комбинируются нейронные сети, тем богаче когнитивная функция мозга. Иными словами, высшее достижение эволюции — ум человека основано на рекомбинациях. Теперь, через 100 лет после догадки Кахалья, это знают все. Однако даже, очень талантливый и смелый в проявлениях интеллекта Кахаль, как и другие замечательные ученые, понявшие свойство рекомбинаций, быстро, энергоэкономно создавая практически бесконечное разнообразие различных качеств системы не уловили философского значения рекомбинаций, т.е. распространения этой закономерности на все явления мира.

В литературе по патологии слово комбинации до Д.С. не встречалось. Он создал на современном ему уровне медицинских знаний учение о комбинационных преобразованиях в области общей патологии. Но будучи, извините за кощунство, диалектиком «от Бога» он понял сразу — это видно из первой публикации, поданной в Архив патологии 28.12.1991 г. [13], что обнаружил не просто неизвестную ранее особенность живых систем, а открыл новый закон философии. Правда, сам Донат Семенович свое от-

крытие так никогда не называл, но его друзья, решившие после его смерти добиться официального закрепления за ним приоритета в этом открытии, сформулировали его как «Закон комбинационных преобразований» — 4-й закон философии, закон Д.С.Саркисова. В апреле 2004 г. Международная академия авторов научных открытий и изобретений выдала диплом на это открытие. Формула открытия. «Установлен неизвестный ранее закон комбинационных преобразований, заключающийся в том, что свойства системы (живой и неживой природы) определяются сочетанием составляющих её элементов и изменяются при их перестановке, перегруппировке, рекомбинации (закон материалистической диалектики)». Ни один человек в мире за всю его историю не получал диплома на открытие в области философии. Почему?

Дело в том, что открытия законов, категорий, понятий философии в их современной формулировке — это коллективный труд многих великих умов человечества. Практически все основные положения диалектики были высказаны ещё античными авторами. Эти высказывания, хотя и недостаточно четкие, слабо доказанные, с элементами гениальных догадок и наивных фантазий, тем не менее, были уже философскими, т.е. имеющими не частное, а всеобщее, вселенское значение, распространяющееся на все явления мира. Позднейшие философы, в том числе и современные, эти положения уточняли, развивали, согласовывали с лавинообразно нарастающим материалом частных наук, но их уже нельзя было признать авторами.

У Доната Семеновича ситуация иная. Он понял, что упомянутые мной и все другие конкретные примеры комбинационных преобразований являются частными проявлениями всеобщего, т.е. философского закона, распространяющегося на живую и неживую природу, общество и мышление, закона, выражающего не описанную до него форму движения материи. Ни современных, ни античных предшественников у него нет.

Поэтому вполне справедливо присуждение Д.С.Саркисову приоритета в открытии. Ф.Энгельс писал: «...то, что некоторый всеобщий закон развития природы, общества и мышления впервые высказан в его общезначимой форме — это всегда остается подвигом всемирно исторического значения» [14].

Почему это удалось сделать Д.С.? Думаю, потому, что он соответствовал определению Пушкина: «гений, парадоксов друг». Обладал редким, драгоценным качеством — умением вырываться из плена стереотипных суждений, рассматривать явления свежим взглядом и с разных сторон, так, что в его представлении они становились как бы объемными, выявлялись особенности явлений, неразличимые для плос-

кого взгляда. Его дар выражался и ещё в одной замечательной особенности: великолепно юморе. Юмор — способность не банально взглянуть на объект юмора, т.е. тоже парадокс. Д.С. мог увидеть закономерность, строй в нестройном вихре фактов и явлений. Ученые такого типа редки, но их труд, их талант был, есть и будет главным фактором развития науки. Только они могут удержать науку на позиции занятия открывающего и объясняющего мир, а не огромного склада очень мелких, но зато очень многочисленных не связанных между собой фактов [15—17]. Самобытных ярких людей меньше, чем банальных. Поэтому дефицит идей, вносящих порядок в накопленные знания, по-видимому, вечное состояние науки. Опасность захламления науки незначительностями обозначилась давно. Так, В.В.Пашутин уже в 1885 году писал: «Обобщающие полеты ума в сфере патологических явлений совершенно необходимы, так как запас детальных фактов в настоящее время очень велик и получает характер, за недостатком обобщений, тяготеющего ум балласта, с которым едва может справляться наша память» [18]. Усложнение техники эксперимента и стремительно сужающаяся специализация исследователей бесконечно утяжелили современный «тяготеющий ум балласт». Наверно, пора признать, что, не говоря уже об артефактах, лавина сообщений о мелочных фактах порой уже не развивает науку, а затрудняет её развитие. Потенциальному творцу обобщающей идеи приходится разбираться во всё большем массиве беспорядочной информации. «Погружение в мир частных», как он выражался, всегда заботило Д.С. Об этом кризисе он пишет свою последнюю статью — завещание: «...если мы предполагаем сделать XXI век веком великого анализа, проникновения исследователей к истокам жизни и направленного регулирования нарушенных биологических процессов, то успех будет обеспечен только в том случае, если этот век будет одновременно и веком великого синтеза, веком крупномасштабных теоретических обобщений...» [19].

Уверен, что феномен, который мы называем Д.С.Саркисов, обусловлен не только интеллектом, но, в меньшей степени, и морально-нравственными чертами этого человека. Несколько слов о них.

В школьные годы Д.С. больше всего интересовался литературой и историей и, формально рассуждая, попал в медицину случайно, но это была закономерность, обусловленная слитностью его судьбы с судьбой Отечества. Он окончил 10-й класс летом 1942 г., когда все прочие интересы ушли на второй план, а на первое место встала защита Родины. Д.С. был призван в Армию и направлен военкоматом в Военно-Морскую медицинскую академию. Очень важным моментом своей жизни Д.С. считал назначение оппо-

нентом на защите его кандидатской диссертации профессора С.С.Вайля. С.С.Вайль стал его любимым учителем, которому, как считает Д.С., он «обязан всем: прививкой ему любви к прозекторскому делу, к медицинской науке, ее истории, литературе, искусству, философским основам медицины, в общем, ко всему тому, что является главным в жизни ученого, но что так нелегко встретить на своем пути». Думаю, в этих словах есть некоторое преувеличение, естественное для человека преисполненного любви и благодарности к своему учителю. Несомненно, Д.С. был щедро одарен природой, но также несомненно, что С.С.Вайль способствовал развитию его природного дара. Особенно значимым Д.С. считает то, что его учитель был олицетворением того, что сам он представлял себе главным в человеке вообще и в ученом, в особенности, — скромности, порядочности, доброго отношения к людям, доброжелательности и все это сочеталось в С.С.Вайле с огромными, разносторонними знаниями и талантом искуснейшего диагноста в аутопсийном и биопсийном деле.

Любые мнения, идеи, высказывания, Д.С. воспринимал критично, т.е. сопоставлял со своим отношением к теме и восприятием окружающего мира. Поэтому называл своими учителями людей, мысли которых он принимал, соглашался с ними, порой восхищался, которые были для него примером высокого интеллекта и нравственной силы. С этими учителями его связывало родство душ, мировоззрений, жизненной позиции, отношения к миру и науке. За исключением С.С.Вайля никто из них не был учителем Д.С. в формальном смысле. Более того, за исключением И.В.Давыдовского, с которым он был знаком и дружен, никого из людей называемых Д.С. учителями он даже никогда не видел. А кроме С.С.Вайля и И.В.Давыдовского, он называл учителями: А.С.Пушкина, А.П.Чехова, Р.Вирхова, С.М.Лукьянова.

Вайлю Д.С. посвятил свою первую, по существу, книгу (до неё он издал только брошюру в 70 стр., содержание его докторской диссертации). Книга: «Воспроизведение болезней человека в эксперименте», была, в свое время, наиболее полным в мировой литературе обобщением по этой проблеме (780 стр. текста и 4 тысячи литературных источников) [20]. Монография получила широкую известность у нас и за рубежом (неоднократно запрашивалась на время библиотеками Кембриджа, Парижа, Берлина). Описывая модель атеросклероза, возникающего при кормлении кроликов яичным желтком, Д.С. указал действительного автора этого метода — А.И.Игнатовского. Как мы все знаем, автором модели атеросклероза считается Н.Н.Аничков, может быть, считается справедливо, если учесть его труд по разработке кон-

цепции атеросклероза. Н.Н.Аничков — фигура в медицинском мире крупная: академик АМН СССР и АН СССР, президент АМН СССР. В Медгизе сочли, что ссылка на А.И.Игнатовского наносит ущерб большому начальнику и соглашались издать книгу после небольших изменений в разделе атеросклероза. Д.С. уважал Н.Н.Аничкова, даже написал о нем книгу, но будучи принципиальным материалистом, принцип ставил все же выше материализма, по крайней мере, выше материальных благ. Он не стал зачеркивать в рукописи всего одну крамольную строчку. Издал книгу не в Медгизе, а под эгидой Института им. А.В.Вишневого, не получил ни копейки гонорара, напротив, сам оплатил все расходы по изданию.

Работая почти 40 лет с Д.С. я, конечно, знал, какой это был великий труженик, но как раз на примере книги «Воспроизведение болезней человека...» имел случай убедиться в этой его особенности в «весомой, грубой, зримой» форме. Однажды, разыскивая что-то в чулане нашего отдела, я наткнулся на ящик с примерными габаритами 80 x 80 x 60 см, доверху заложённый библиографическими карточками. Они все оказались заполненными рукой Д.С. и все относились только к одной книге: «Воспроизведение болезней человека...». Кто-то сказал: «Гений — это терпение» Это лишь полуправда. Гений, наверно, в большей степени — талант и вдохновение, но у нашего гения и терпения хватало.

Из 32 книг Д.С. я сказал два слова о первой и столько же скажу о последней. Это «Рекомбинации как механизм многообразия в явлениях природы» [21]. В ней Д.С. излагает суть открытого им закона комбинационных преобразований и приводит доказательства, взятые из мира природы. Этот раздел занимает примерно 10% объема книги. Остальной объем посвящен анализу действия закона в социальной сфере. Анализ получился очень убедительный и тем особенно горький. Д.С. пишет о Родине, о разрушении России в конце XX века. В отличие от предыдущих строгих академических книг создает публицистическое, страстное, с душевной болью и сарказмом, и, в то же время вполне научное произведение, полное «ума холодных наблюдений и сердца горестных замет». Не пересказывая идеи Д.С., относящиеся к историческому материализму, скажу только, что политические события последних пятидесяти лет гораздо больше соответствуют историческому материализму Саркисова, нежели историческому материализму К.Маркса.

Д.С. чрезвычайно заинтересовано относился ко всем явлениям жизни: к истории Родины и медицины, к культуре, искусству, к политике, общественной жизни, прекрасно знал и любил русскую литературу.

Он рассказывал: «Родители хотели обучать меня игре на скрипке. Но мне повезло — я сломал руку». Шутка вовсе не означает его равнодушия к музыке. Он был человек музыкальный, любил и эмоционально воспринимал музыку, если напевал что-нибудь, то точно, никогда не фальшивил. Любил общаться с самыми разными людьми, и сам был очень интересен и прост в таких разговорах, в них раскрывался его ум, богатый духовный мир, большое обаяние. Его шутки постоянно обогащали институтский фольклор. У него есть замечательные произведения об истории страны, войны, медицины, трудах наших выдающихся медиков, об одном из его любимых писателей А.П.Чехове. Он горячо отстаивал научное материалистическое мировоззрение, главенство разума, боролся с современными проявлениями лженауки. Часто повторяя в шутку гоголевскую фразу из «Ревизора» — «Не приведи бог служить по ученой части!», Д.С., говоря серьезно, самым замечательным делом считал науку, верил в её высокое предназначение, в то, что она вместе с искусством открывает гармонию мира. С каждым днем всё актуальнее становится призыв его последней статьи [11] и пример всей его жизни: находить обобщающие идеи.

### Список литературы

1. Саркисов Д.С. *Очерки по структурным основам гомеостаза*. М.: Медицина; 1977
2. Саркисов Д.С., Пальцын А.А., Втюрин Б.В. *Электронно-микроскопическая радиоавтография клетки*. М.: Медицина; 1980.
3. Саркисов Д.С. О формах регенераторной реакции. *Экспериментальная хирургия*. 1962; 2: 3-8
4. Саркисов Д.С. *Очерки истории общей патологии*. М.: Медицина; 1993
5. Саркисов Д.С. Некоторые вопросы современного состояния проблемы антагонистической регуляции функций. *Архив патологии*. 1974;10: 3-13
6. West J.B. *Respiratory Physiology*. La Jolla.: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
7. Кедров Б.М. *О количественных и качественных изменениях в природе*. М.: Госполитиздат; 1946.
8. Тимофеев И.С. *Методологическое значение категорий «качество» и «количество»*. М.: Наука; 1972.
9. *Советский энциклопедический словарь*. М.: Советская энциклопедия; 1983
10. Азимов А. *Генетический код. От теории эволюции до расшифровки ДНК*. М.: Центрполиграф; 2006.
11. Хаитов Р.М. *Иммунология*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2006.
12. Cajal S. Цит. по: Arendt Th. Synaptic plasticity and cell cycle activation in neurons are alternative effector pathways: the 'Dr. Jekyll and Mr. Hyde concept' of Alzheimer's disease or the yin and yang of neuroplasticity. *Progress in Neurobiology*. 2003;71: 83-248.
13. Саркисов Д.С. Рекомбинационные преобразования как один из механизмов качественных изменений в живых системах. *Архив патологии*. 1992; 5: 5-9.



14. Энгельс Ф. *Диалектика природы*. М.: Политиздат; 1987.

15. Ельский В.Н., Колесникова С.В., Заведя Т.Л. и др. Нарушение оксидантно-антиоксидантной регуляции ПОЛ на внутриклеточном уровне при шоке. *Патогенез*. 2007; 1-2: 131-6.

16. Федотова Ю.О. Комбинированное введение RJR-2403 с низкой дозой 17 $\beta$ -эстрадиола улучшает пространственное обучение у овариоэктомированных крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2013; 3: 37-41.

17. Цымбал А.А., Киричук В.Ф. Изменения газового и электролитного состава крови под влиянием терагерцевой излучения на частотах оксида азота 150, 176-150,664 ГГц в условиях стресса. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2011; 1: 49-51.

18. Пашутин В.В. *Курс общей и экспериментальной патологии*. СПб.: Типография Н.А. Лебедева; 1885. Т. 1.

19. Саркисов Д.С. Некоторые особенности развития медико-биологических наук в последние столетия. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2001, №1, с. 5-10.

20. Саркисов Д.С., Ремезов П.И. *Воспроизведение болезней человека в эксперименте*. М.: Институт хирургии имени А.В. Вишневского; 1960.

21. Саркисов Д.С. *Рекомбинации как механизм многообразия в явлениях природы*. М.: 1999.

### References

1. Sarkisov D.S. *Essays on the structural basis of a homeostasis*. M.: Medicina; 1977. (in Russian)

2. Sarkisov D.S., Paltsyn A.A., Vtjurin B.V. *Electron microscopic autoradiography cell*. M. «Medicina» 1980. (in Russian)

3. Sarkisov D.S. On the forms of regenerative response. *Jeksperimental'naja hirurgija*. 1962; 2: 3-8. (in Russian)

4. Sarkisov D.S. *Essays on the history of general pathology*. M.: Medicina; 1993. (in Russian)

5. Sarkisov D.S. Some questions of the current state of the antagonistic regulation of functions. *Arhiv patologii*. 1974; 10: 3-13. (in Russian)

6. West J.B. *Respiratory Physiology*. La Jolla.: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.

7. Kedrov B.M. *About quantitative and qualitative changes in the nature*. M.: Gospolitizdat; 1946. (in Russian)

8. Timofeev I.S. *Methodological significance of the categories «quality» and «quantity»*. M.: Nauka; 1972. (in Russian)

9. *Sovetskij jenciklopedicheski slovar'*. M.: Sovetskaja jenciklopedija; 1983 (in Russian).

10. Azimov A. *Genetic code. From the theory of evolution to decode DNA*. M.: Centrpoligraf; 2006. (in Russian).

11. Haitov R.M. *Immunology*. M.: GJeOTAR-Media; 2006. (in Russian)

12. Cajal S. Quotation from: Arendt Th. Synaptic plasticity and cell cycle activation in neurons are alternative effector pathways: the 'Dr. Jekyll and Mr. Hyde concept' of Alzheimer's disease or the yin and yang of neuroplasticity. *Progress in Neurobiology*. 2003; 71: 83-248.

13. Sarkisov D.S. Recombination transformation as one of the mechanisms of qualitative changes in living systems. *Arhiv patologii*. 1992; 5: 5-9. (in Russian)

14. Engels F. *Dialectics of Nature*. M.: Politizdat; 1987. (in Russian)

15. El'skij V.N., Kolesnikova S.V., Zavedeja T.L. i dr. Violation of the oxidant-antioxidant regulation of lipid peroxidation at the intracellular level in shock. *Patogenez*. 2007; 1-2: 131-6. (in Russian)

16. Fedotova Ju.O. Combined administration of RJR-2403 with low dose of 17 $\beta$ -estradiol improves spatial learning in rats with ovary ectomy. *Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja terapija*. 2013; 3: 37-41. (in Russian)

17. Cymbal A.A., Kirichuk V.F. Changes of gas and electrolyte composition of the blood under the influence of terahertz radiation at frequencies of nitric oxide 150, 176-150,664 GHz in stress. *Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja terapija*. 2011; 1: 49-51. (in Russian)

18. Pashutin V.V. *Course of General and Experimental Pathology*. SPb.: Tipografija N.A. Lebedeva; 1885; T. 1. (in Russian)

19. Sarkisov D.S. Some features of the development of life sciences in the last century. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny*. 2001; 1: 5-10. (in Russian)

20. Sarkisov D.S., Remezov P.I. *Reproduction of human diseases in the experiments*. M.: Institut hirurgii imeni A.V. Vishnevskogo; 1960. (in Russian)

21. Sarkisov D.S. *Recombination as a mechanism of diversity in natural phenomena*. M.: 1999. (in Russian)

Поступила 10.12.14

Receiver 10.12.14

## Правила оформления статей для публикации в журнале «Патологическая физиология и экспериментальная терапия»

1. Статьи, оформленные без соблюдения указанных правил, к рассмотрению не принимаются.

2. Все присланные работы обязательно проходят этап научного рецензирования, редакция оставляет за собой право сокращения публикуемых материалов и адаптации их к рубрикам журнала.

3. В редакцию направляются 2 экземпляра рукописи, которые сопровождаются направительным письмом учреждения, заверенным ответственным лицом, на имя главного редактора журнала. К рукописи прилагается электронный носитель (диск — CD), содержание которого должно быть идентичным принтерной распечатке.

4. Текст печатается в тестовом редакторе Word шрифтом Times, 14 кеглем, через 1,5 интервала на листе А4. Поля верхнее и нижнее — 2,5 см, поле слева — 3,5 см, поле справа — 1,5. Запрещается использование автоматических переносов. Внизу справа проставляется нумерация страниц.

5. Объем оригинальных статей не должен превышать 8 страниц; обзоров — 15; кратких сообщений — 3 страницы. Исключение — заказные обобщающие статьи, объем которых оговаривается редколлекцией с автором.

6. Оформление титульной страницы:

- имя, отчество, фамилия(и) автора(ов);
- название статьи (без аббревиатуры);
- полное официальное название учреждения и его полный почтовый адрес;
- принадлежность авторов к учреждению обозначается надстрочным индексом в порядке упоминания.

7. Оригинальная статья должна содержать разделы:

- введение (краткое обоснование цели);
- методика (с четким, легко воспроизводимым описанием);
- результаты и обсуждение;
- литература.

8. К оригинальной статье необходимо приложить резюме с ключевыми словами (на русском и английском языках). Резюме должно отражать основное содержание работы. В начале резюме приводятся: УДК, фамилии авторов, затем название статьи. Резюме печатается на отдельной странице.

9. Статья тщательно выверяется автором(ами): формулы, таблицы, дозы визируются авторами на полях, латинские и греческие буквы помечаются на полях (лат., греч.).

10. Статья подписывается всеми авторами. На отдельной странице указываются полные сведения об авторах: ученая степень, ученое звание, должность, кафедра, отделение, почтовый и электронный адреса всех учреждений, телефоны.

11. Количество графического материала должно быть минимальным. Все цифровые данные должны сопровождаться соответствующими единицами в системе единиц СИ.

12. Таблицы должны быть компактными, названия должны точно соответствовать содержанию граф. Сокращения слов не допускается. Данные таблиц не

должны дублироваться графиками и повторяться в тексте статьи.

Обязательно указание методов, программ статистической обработки материала.

13. В формулах должны быть четко размечены все элементы: латинские буквы — синим, греческие — красным; индексы надстрочные ( $A^1$ ) и подстрочные ( $A_1$ ), буквы прописные (A) и строчные (a), сходные буквы и цифры (O, буква, 0, цифра).

14. Аббревиатура допускается только при первоначальном упоминании с указанием полного названия.

15. Цитируемая литература приводится в алфавитном порядке на отдельном листе. В статье, в квадратных скобках, дается ссылка на порядковый номер источника. В списке литературы сначала указываются отечественные авторы, потом иностранные. Работы отечественных авторов, опубликованные на иностранных языках, помещаются среди работ иностранных авторов в общем алфавитном порядке, а работы иностранных авторов, опубликованные на русском языке — среди работ отечественных авторов в общем алфавитном порядке.

Если цитируются несколько работ одного автора, их нужно указывать в хронологическом порядке. Статья, написанная коллективом авторов (более 4 авторов), помещается в списке литературы по фамилии первого автора, при этом указываются еще два автора, а далее ставится «и др.». Если авторов всего 4, то указываются все авторы. После фамилии авторов приводится полное название статьи, источник, год, том, номер, выпуск, страницы (от и до); для книг, сборников, авторефератов и диссертаций обязательно указать их точное название, издательство, город, год.

Книга, написанная коллективом авторов (более 4 человек), помещается в списке по ее названию, а далее через косую черту указываются фамилии трех авторов, далее ставится «и др.». В монографиях иностранных авторов, изданных на русском языке, после названия книги через двоеточие указывается с какого языка сделан перевод. Ссылки на неопубликованные работы, работы для ограниченного пользования, диссертации, рабочие документы ВОЗ не допускаются.

16. Направление в редакцию работ, опубликованных в других изданиях или же посланных для печати в другие редакции, не допускается.

17. Статьи, оформленные не по правилам, возвращаются авторам без рассмотрения.

18. Рукописи, не принятые к печати, авторам не возвращаются.

19. Датой поступления статьи считается время поступления ее окончательного (переработанного) варианта.

20. Плата с аспирантов за публикацию рукописей не взимается.

Статьи направляются по адресу: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8. УРАМН НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН. Редакция журнала «Патологическая физиология и экспериментальная терапия».