

ПОЧТОВЫЙ АДРЕС:

125315, Москва, ул. Балтийская, 8.
Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«ФГБНУ общей патологии и патофизиологии»

Редакция журнала
«Патологическая физиология
и экспериментальная терапия».
Home page: www.jpptet.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 диссертаци-
ций на соискание ученой степени докто-
ра и кандидата наук.

ИФ РИНЦ 2013 0,600

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**

Сдано в набор 10.03.2016 г.
Подписано в печать 22.03.2016 г.

ISSN 0031-2991

Пат. физиол. и экспер. тер.
2016. Том 60. № 4. 1–100

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», 2015.

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НИИ ОБЩЕЙ ПАТОЛОГИИ И ПАТОФИЗИОЛОГИИ»**

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

*и ежеквартальный рецензируемый научно-практический журнал
Основан в 1957 г.*

Том 60, № 1, 2016

Январь—март

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор Б.Б. Мороз

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

В.А. Фролов

Редакционный совет

Ю.В. Балякин (Москва), Ю.Ю. Бяловский (Рязань),
Ф. Дауни (США), В.Т. Долгих (Омск), А.М. Дыгай (Томск),
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

ИФ РИНЦ 2013 0,600

ISSN 0031-2991
Pathological
physiology
and experimental
therapy
2016. Vol. 60. № 1. 1–100

Moscow

© ООО «Гениус Медиа», 2015.

THE INSTITUTE OF GENERAL PATHOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY

PATOLOGICHESKAYA FISIOLOGIYA I EKSPERIMENTAL'NAYA TERAPIA

Pathological physiology and experimental therapy

*Quarterly reviewed science and practical journal
Published since 1957*

Vol. 60, № 1, 2016

January—March

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,

V.A. Frolov

Staff

Yu.V. Balyakin (Moskva), Yu.Yu. Byalovskiy (Ryazan),
F. Downey (USA), V.T. Dolgikh (Omsk), A.M. Dygay (Tomsk),
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)

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Ветрилэ Л.А., Захарова И.А., Кудрин В.С., Клодт П.М.** Влияние антител к глутамату при интраназальном введении на содержание возбуждающих и тормозных аминокислот в гиппокампе и гипоталамусе крыс при комбинированном стрессорном воздействии 4
- Панкова Н.Б., Лебедева М.А., Хлебникова Н.Н., Карганов М.Ю.** Возрастные изменения латентных периодов простой сенсомоторной реакции на световой стимул у мужчин и женщин с разным индексом массы тела 11
- Конопля А.И., Шульгинова А.А.** Хроническая ишемия головного мозга: состояние структурно-функциональных свойств эритроцитов . . . 17
- Порядин Г.В., Власов А.П., Трофимов В.А., Власова Т.И., Камкина О.В., Григорьев А.Г., Власов П.А.** Кислородтранспортная способность гемоглобина при хирургическом эндотоксикозе 23
- Маслов Л.Н., Цибульников С.Ю., Нарыжная Н.В., Иванов В.В., Цибульникова М.Р.** Хроническое воздействие холода — адаптация без стресса. 28
- Радзинский В.Е., Оразов М.Р., Носенко Е.Н.** Экспрессия сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF) в тканях матки как один из механизмов аллогенеза при аденомиозе, ассоциированном с хронической тазовой болью 32
- Хныченко Л.К., Окуневич И.В., Лосев Н.А., Сапронов Н.С.** Исследование гиполипидемического свойства n-холинолитика бензогексония в эксперименте 36
- Оразов М.Р., Радзинский В.Е., Носенко Е.Н.** Роль воспаления и иммунореактивности в развитии болевого синдрома при аденомиозе . . 40
- Еркудов В.О., Пуговкин А.П., Верлов Н.А., Сергеев И.В., Иевков С.А.** Погрешность расчёта системного артериального давления с применением передаточных функций при изменении объема циркулирующей крови в остром эксперименте 45

ОБЗОРЫ

- Панченко Л.Ф., Баронец В.Ю., Наумова Т.А., Пирожков С.В., Теребилина Н.Н., Шойбонов Б.Б.** Роль липопротеин-ассоциированного фермента параоксаназы-1 и его полиморфизмов в патогенезе эндотелиальной дисфункции и развитии соматических осложнений у больных алкоголизмом . . 50
- Никифоров Н.Г., Елизова Н.В., Никитина Н.А., Карагодин В.П., Орехов А.Н.** Активация макрофагов при атеросклерозе. Сообщение 2. Факторы, влияющие на активацию макрофагов. . . 59
- Сухоруков В.Н., Карагодин В.П., Орехов А.Н.** Современные подходы к дифференциальной диагностике дислипидемий 65
- Батырова А.С., Баканов М.И., Сурков А.Н.** Состояние системы ремоделирования сосудов и ангиогенеза печени при хронических формах ее патологии 73
- Арушанян Э.Б., Щетинин Е.В.** Мелатонин как универсальный модулятор любых патологических процессов 79

МЕТОДИКА

- Петрищев Н.Н., Цибин А.Ю., Семенов Д.Ю., Беркович А.Е., Юкина Г.Ю., Блюм Н.М., Ефимов А.Н., Бурсиан А.А., Сенчик К.Ю.** Применение фокусированного ультразвука высокой интенсивности для облитерации вен в эксперименте 89
- Иванов Ю.Д., Мальсагова К.А., Пleshакова Т.О., Шумов И.Д., Кайшева А.Л., Попов В.П., Наумова О.В., Фомин Б.И., Насимов Д.А., Латышев А.В., Асеев А.Л., Татур В.Ю., Иванова Н.Д., Коновалова Г.М., Арчаков А.И.** Регистрация белка в сыворотке крови с помощью биосенсора на базе полевого нанотранзистора. 94

ХРОНИКА

- Кубышкин А.В., Ломакин Н.В., Бурячковская Л.И., Коваленко Е.П.** Новые подходы к исследованию воспаления (Информация о XII Всемирном Конгрессе по воспалению). 99

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- Vetrile L.A., Zakharova I.A., Kudrin V.S., Klodt P.M.** Effect of intranasally administered glutamate antibodies on the content of excitatory and inhibitory amino acids in the rat's hippocampus and hypothalamus at the combined stress exposure
- Pankova N.B., Lebedeva M.A., Khlebnikova N.N., Karganov M.Yu.** Age-related changes of the latent period of simple sensorimotor reaction to the light stimuli in both men and women with different body mass index
- Konoplya A.I., Shulginova A.A.** Chronic ischemia of the brain: state structurally functional properties of erythrocytes
- Poryadin G.V., Vlasov A.P., Trofimov V.A., Vlasova T.I., Kamkina O.V., Grigoryev A.G., Vlasov P.A.** Hemoglobin oxygen transport capacity in surgical endotoxemia
- Maslov L.N., Tsibulnikov S.Yu., Naryzhnaia N.V., Tsibulnikova M.R.** Chronic exposure to cold is adaptation without stress
- Radzinskiy V.E., Orazov M.R., Nosenko O.M.** Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in uterine tissues as one of the mechanisms of allogeneisis in adenomyosis, associated with chronic pelvic pain
- Khnychenko L.K., Okunevich I.V., Losev N.A., Sapronov N.S.** Hypolipidemic activity of N-cholinergic antagonist Benzohexonium in the experiments
- Orazov M.R., Radzinskiy V.E., Nosenko O.M.** The role of inflammatory and immune reactivity in developing pain in adenomyosis
- Erkudov V.O., Pugovkin A.P., Verlov N.A., Sergeev I.V., Ievkov S.A.** Systemic errors in the estimation of systemic arterial pressure via transfer functions after experimental changes of the circulating blood volume

REVIEWS

- Panchenko L.F., Baronets V.Yu., Naumova T.A., Pyrozhhov S.V., Terebilina N.N., Shoibonov B.B.** The role of lipoprotein-associated enzyme paraoxonase 1 and its polymorphisms in the pathogenesis of endothelial dysfunction and somatic complications in patients with alcoholism: Review
- Nikiforov N.G., Elizova N.V., Nikitina N.A., Karagodin V.P., Orekhov A.N.** Macrophage activation in atherosclerosis. Message 2. effects of factors on macrophage activation
- Sukhorukov V.N., Karagodin V.P., Orekhov A.N.** Modern methods of diagnosis dyslipidemia
- Batyrova A.S., Bakanov M.I., Surkov A.N.** Current status of vascular remodeling and angiogenesis in chronic liver diseases
- Arushanian E.B., Schetinin E.V.** Melatonin as a universal modulator of any pathological processes

METHODS

- Petrishchev N.N., Tsibin A.U., Semenov D.U., Berkovich A.E., Yukina G.U., Blum N.M., Efimov A.N., Bursian A.A., Senchik K.U.** Applying HIFU for the obliteration of the veins in the experiment
- Ivanov Yu.D., Malsagova K.A., Pleshakova T.O., Shumov I.D., Kaysheva A.L., Popov V.P., Naumova O.V., Fomin B.I., Nasimov D.A., Latyshev A.V., Aseev A.L., Tatur V.Yu., Ivanova N.D., Konovalova G.M., Archakov A.I.** Registration of the protein in the serum with a field-effect nanotransistor biosensor

CHRONICLE

- Kubyshkin A.V., Lomakin N.V., Buryachkovskaya L.I., Kovalenko E.P.** New approaches to the study of inflammation (about XII World Congress on Inflammation)

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616-092

Ветрилэ Л.А.¹, Захарова И.А.¹, Кудрин В.С.², **Клодт П.М.²**

Влияние антител к глутамату при интраназальном введении на содержание возбуждающих и тормозных аминокислот в гиппокампе и гипоталамусе крыс при комбинированном стрессорном воздействии

¹ — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Цель. Изучали влияние антител к глутамату при интраназальном введении на развитие стресс-реакций и содержание возбуждающей (аспартата) и тормозных (глицина и таурина) аминокислот в структурах головного мозга крыс с разной исходной поведенческой активностью.

Методика. Стресс вызвали помещением животных в жилую клетку с водой (21°C), покрытую сеткой, на 30 мин. Сразу после стрессорного воздействия крысам опытной группы вводили интраназально антитела к глутамату в дозе 250 мкг/кг массы в объеме 10 мкл. Через 1 ч после стрессорного воздействия и введения антител у всех крыс исследовали двигательную активность в тесте «открытого поля». Нейромедиаторные аминокислоты аспартат, таурин и глицин в структурах мозга определяли методом ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией.

Результаты. Стрессорная нагрузка вызвала существенные изменения поведенческой активности крыс в «открытом поле», но более выраженное снижение суммарного показателя активности наблюдали в группе поведенчески пассивных крыс. Стрессорное воздействие сопровождалось изменением содержания нейромедиаторных аминокислот (глицина и таурина) в гиппокампе. Наиболее существенные изменения уровней глицина (снижение) и таурина (увеличение) наблюдали в гиппокампе поведенчески активных крыс. Антитела к глутамату в дозе 250 мкг/кг при интраназальном введении крысам сразу после стрессорного воздействия предупреждали развитие поведенческих стресс-реакций и способствовали увеличению содержания в гиппокампе нейромедиаторных аминокислот глицина и таурина, относящихся к стресс-лимитирующим системам.

Заключение. Антитела к глутамату при стрессорном воздействии выступают как эндогенные биорегуляторы и предупреждают развитие стресс-реакций.

Ключевые слова: антитела к глутамату, стресс, глутамат, ГАМК, глицин, таурин.

Для цитирования: Ветрилэ Л.А., Захарова И.А., Кудрин В.С., Клодт П.М. Влияние антител к глутамату при интраназальном введении на содержание возбуждающих и тормозных аминокислот в гиппокампе и гипоталамусе крыс при комбинированном стрессорном воздействии. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016; 60(1): 4–10

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Vetrile L.A.¹, Zakharova I.A.¹, Kudrin V.S.², **Klodt P.M.²**

Effect of intranasally administered glutamate antibodies on the content of excitatory and inhibitory amino acids in the rat's hippocampus and hypothalamus at the combined stress exposure

¹ — «Scientific Research Institute of General pathology and pathophysiology» Baltiyskaya St., 8, Moscow, 125315, Russia

² — Institute of pharmacology. V.V. Zakusova, 125315, Moscow, Russia, Baltiyskaya str., 8

Objective. We studied the effect of glutamate antibodies by intranasal administration on the development of stress reactions and aspartate, glycine and taurine content in the brain structures of rats with different initial behavioral activity (active and passive).

Methods. Stress caused by placing the animals in the living cell with water (21°C) covered with a grid for 30 min. Glutamate antibodies in a dose of 250 µg/kg in a volume of 10 µkl were administered intranasally to the experimental group of rats immediately after the stress. After 1 h after stress exposure and antibodies administration in all rats was inves-

Для корреспонденции: Ветрилэ Лучия Александровна, к.м.н., вед. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ НИИОПП, e-mail: Vetrile.l@yandex.ru

tingated motor activity in the test of the «open field». Amino acids aspartate, glycine and taurine in the brain structures (hippocampus and hypothalamus) were determined by HPLC with fluorescence detection.

Results. *Combined water-immersion stress caused significant changes in the behavioral activity of rats in the «open field», but a more pronounced decline in the total index were observed in the behaviorally passive group of rats. The stress was accompanied by a change in the content of neurotransmitter amino acids (glycine and taurine) in the hippocampus. The most significant changes in the levels of glycine (decrease) and taurine (an increase) was observed in the hippocampus behaviorally active rats. Glutamate antibodies at a dose of 250 mg/kg administered intranasally immediately after stress exposure prevents the development of behavioral stress reactions and contributed to an increase in the hippocampus the content of glycine and taurine, related to stress-limiting systems.*

Conclusions. *The glutamate antibodies under stress act as endogenous bioregulators and prevent the development of stress reactions.*

Keywords: *antibodies to glutamate; stress; glutamate; GABA; glycine; taurine*

For citation: Vetrile L.A., Zakharova I.A., Kudrin V.S., Klodt P.M. Effect of intranasally administered glutamate antibodies on the content of excitatory and inhibitory amino acids in the rat's hippocampus and hypothalamus at the combined stress exposure. Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya. 2016; 60(1): 4–10. (in Russian)

For correspondence: *Vetrile L.A., e-mail: Vetrile.l@yandex.ru*

Conflict of interest. *The authors declare no conflict of interest.*

Funding. *The study had no sponsorship.*

Известно, что первичной реакцией на стрессорные нагрузки являются изменения в ЦНС, особенно в лимбико-ретикулярных структурах головного мозга. Стресс-реакция сопровождается значительным изменением обмена нейромедиаторов в ЦНС, нарушением взаимодействия между двумя основными процессами нервной деятельности — возбуждением и торможением, и активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси [1—3]. Возбуждающие и тормозные нейромедиаторные аминокислоты наряду с дофамин- и адренергическими системами играют важную роль в механизмах развития стресс-реакций. Многие центральные аспекты стресс-ответов, включая активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и дофаминовой нейротрансмиссии, модулируются, а в некоторых случаях опосредуются, глутаматергической системой [4]. Было показано, что острое стрессорное воздействие вызывает увеличение уровня внеклеточного глутамата в базо-латеральном и центральном ядрах амигдалы [5]. Психоземotionalный стресс в виде длительной изоляции [6], как и продолжительная стрессорная нагрузка (иммобилизация с последующим принудительным плаванием) [7], вызвали снижение уровня глутамата, глутамина и N-ацетил-L-аспартата в дорсальном гиппокампе и в префронтальной коре. Существенное снижение содержания глутамата в гиппокампе наблюдали при комбинированном иммобилизационном стрессе у поведенчески активных крыс [8]. Исследование методом микродиализа динамики изменения уровня глутамата в дорсальном гиппокампе при комбинированном иммобилизационном стрессе у крыс с разной исходной поведенческой активностью показало достоверное снижение его содержания у поведенчески активных крыс в постстрессорном периоде (с 20 по 60-й мин) по сравнению с исходным уровнем. В то же время у поведенчески пассивных животных в течение

первых 20 мин иммобилизационной стрессорной нагрузки было выявлено достоверное возрастание содержания глутамата в дорсальном гиппокампе с последующим восстановлением до исходного значения [9]. В опытах на крысах было показано снижение уровня глутамата и активности глутаминазы в коре и мозжечке и увеличение его содержания в гиппокампе и стриатуме при хроническом шумовом стрессе (75—95 децибел 3—4 раза в день в течение 5 дней) [10]. К возбуждающим нейромедиаторным аминокислотам относятся аспарагиновая кислота (аспартат), которая по своей структуре, метаболизму и физиологическим эффектам на нейрональном уровне идентична глутамату [1].

Тормозные нейромедиаторные аминокислоты — ГАМК, таурин и глицин играют большую роль в модуляции стресс-ответов [11, 12]. В результате многочисленных экспериментальных исследований было установлено, что ГАМКергическая система при стрессе играет роль неспецифического тормозного механизма, ограничивающего стресс-реакцию и предупреждающего стрессорные повреждения [13]. Существенное снижение ГАМК в гиппокампе и гипоталамусе, а также снижение внеклеточного содержания ГАМК в дорсальном гиппокампе, определяемого методом микродиализа, наблюдали у поведенчески активных крыс при комбинированном иммобилизационном стрессе [8, 14]. Изменение внеклеточной концентрации ГАМК зависит от вида стрессорного воздействия. Было показано, что помещение крыс в новую клетку вызвало значительное увеличение внеклеточного содержания ГАМК в гиппокампе (на 120%), а принудительное плавание, наоборот, существенное снижение ее уровня (на 70%) [15, 16].

Глицин (аминоуксусная кислота) — тормозный нейромедиатор, проявляющий такое же ингибирующее

щее действие, как ГАМК. Глицин стабилизирует потенциал покоя, повышая С1 проводимость синаптической мембраны, его считают основным ингибиторным медиатором в спинном мозге [17]. Наибольшая плотность глициновых рецепторов обнаружена в сером веществе спинного мозга, включая задние и передние рога, в продолговатом и среднем мозге. Иммунохимический анализ глицинового рецептора с помощью моноклональных антител позволил обнаружить существование общих антигенных детерминант рецепторных белков, выделенных из разных областей головного и спинного мозга мышей, крыс, свиней и человека. Некоторые участки глициновых и ГАМК-рецепторов идентичны [18]. В опытах на крысах на модели иммобилизационного стресса было показано стресспротективное действие глицина и его аналогов [19, 20].

Таурин — серосодержащая аминокислота, в ЦНС играет роль нейромедиаторной аминокислоты, тормозящей синаптическую передачу. В центральной нервной системе таурин обладает противосудорожной активностью, модулирует нейрональную гипервозбудимость [21], эксайтотоксическую смерть клеток [22] и гомеостаз кальция [23]. В физиологических условиях таурин аккумулируется в нервных клетках в концентрации 5—70 мМ и выделяется в большом количестве при разных патологических состояниях (судороги, ишемия мозга) [24]. Значительное увеличение концентрации таурина в структурах мозга при патологических состояниях (электрохимические и болевые стимуляции, стресс) свидетельствует о нейропротекторном его эффекте [25, 26].

Стресс-реакция может служить причиной нарушения взаимодействия и взаиморегуляции нервной и иммунной систем, сопровождающейся усилением образования аутоантител к нейромедиаторам. В экспериментальных и клинических исследованиях показана усиленная продукция аутоантител к нейромедиаторам серотонину, катехоламинам, глутамату и ГАМК при таких формах нейропатологии, как экспериментальный болевой синдром [27], эпилепсия (коразоловый киндлинг) [28], психоэмоциональный стресс-синдром [29]. Аутоантитела могут препятствовать прогрессированию нарушений ЦНС, связывая избыточное количество нейротрансмиттеров и их метаболитов в головном мозге, либо усугублять эти нарушения при стойком изменении баланса нейромедиаторных функций мозга. При этом особый интерес представляют антитела к глутамату и ГАМК, относящиеся к основным медиаторам стресс-реализующей и стресс-лимитирующей систем. В опытах на мышах C57Bl/6 и на крысах линии Вистар на модели комбинированного иммобилизационного водно-иммерсионного стресса было показано стресспротективное действие антител

к глутамату при их интраназальном введении, выражающееся в предупреждении развития стресс-реакций и в восстановлении содержания в структурах мозга не только глутамата, но и дофамина и ГАМК [8].

Цель исследования — изучение влияния антител к глутамату при интраназальном введении на развитие стресс-реакций и содержание нейромедиаторных аминокислот аспартата, глицина и таурина в гиппокампе и гипоталамусе крыс с различной исходной поведенческой активностью.

Методика

Исследования проведены на крысах-самцах Вистар ($n = 108$) массой 250—300 г в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных этической комиссией в НИИ общей патологии и патофизиологии, которые соответствует требованиям Всемирного общества защиты животных (WSPA) и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных.

Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном световом режиме и свободном доступа к пище и воде. После недельной адаптации к условиям нахождения в клетке (по 10 особей) исследовали фоновую поведенческую активность животных в тесте «открытое поле» (ОП) в течение 3 мин по следующим показателям: латентное время первого движения и первого захода в центр поля, число пересеченных квадратов, стоек и обследованных объектов. По суммарному показателю активности (СПА), включающему число пересеченных квадратов, стоек и обследованных объектов, крыс разделили на две группы: с высокой (активные, $n = 60$) и низкой (пассивные, $n = 48$) поведенческой активностью. В качестве острой стрессорной нагрузки использовали методику [30], в соответствии с которой животных помещали в жилую клетку с водой (21°C), покрытую сеткой, на 30 мин. Через 1 ч после стрессорного воздействия у всех крыс исследовали двигательную активность в тесте ОП и определяли СПА. По окончании опыта крыс декапитировали. Структуры мозга (гиппокамп и гипоталамус) выделяли на льду и замораживали в жидком азоте. Нейромедиаторные аминокислоты аспартат, таурин и глицин в структурах мозга определяли методом ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией по методике [31]. Антитела к глутамату, полученные по ранее описанной методике [32], вводили интраназально в дозе 250 мкг/кг массы в объеме 10 мкл сразу после стрессорного воздействия. Поведенчески активные и пассивные крысы были разделены на 4 группы: 1-я (интактный контроль) — инт-

раназальное введение физиологического раствора; 2-я — стрессирование и интраназальное введение физиологического раствора; 3-я — стрессирование с интраназальным введением антител к глутамату и 4-я (активный контроль) — стрессирование и интраназальное введение γ -глобулина интактного кролика.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы «Statistica 6.0» с использованием непараметрического U-критерия Манна—Уитни. Результаты представлены в виде среднего значения (M) и ошибки среднего значения (m).

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ исходной фоновой поведенческой реакции в ОП активных и пассивных групп крыс выявил существенные различия показателей горизонтальной, вертикальной и исследовательской активности (табл. 1). СПА в группе поведенчески активных крыс был в 2,7 раза выше, чем в группе пассивных, и составлял $42,6 \pm 3,8$ и $15,5 \pm 3,3$ соответственно. Стрессорная нагрузка сопровождалась достоверным снижением показателей двигательной активности в ОП животных обеих группах, однако

снижение СПА в группе поведенчески пассивных крыс было более выраженным (в 3,6 раза), чем в группе активных (в 2,6 раза) и составлял соответственно $4,3 \pm 1,5$ и $16,1 \pm 3,3$.

Интраназальное введение антител к глутамату сразу после стрессорного воздействия предотвращало снижение показателей двигательной активности животных в ОП (табл. 1). СПА у крыс, получавших интраназально антитела к глутамату, составлял $40,0 \pm 5,6$ и $15,4 \pm 4,2$ соответственно для активных и пассивных и практически не отличался от СПА в контрольной группе животных ($42,6 \pm 3,8$ и $15,5 \pm 3,3$ соответственно). Интраназальное введение γ -глобулина интактного кролика не оказывало влияния на выраженность стрессорных реакций по поведенческим показателям. Следовательно, антитела к глутамату при интраназальном введении сразу после стрессорного воздействия предупреждали развитие поведенческих стресс-реакций.

Результаты определения нейромедиаторных аминокислот в структурах мозга интактных крыс представлены в табл. 2. Существенной разницы в содержании аспартата, глицина и таурина в гиппокампе и гипоталамусе крыс с различной поведенческой актив-

Показатели поведенческой активности крыс в «открытом поле»

Таблица 1

Группа животных	Показатели поведенческой активности (M \pm m)		
	Кол-во пересеченных квадратов	Кол-во стоек	Кол-во обследованных объектов
Группа активных крыс			
Контроль (введение физ. р-ра)	$29,8 \pm 1,9$	$8,22 \pm 2,2$	$4,6 \pm 3,8$
Стресс	$12,4 \pm 2,5^{***}$	$2,28 \pm 0,42^*$	$1,43 \pm 0,61^*$
Стресс + антитела к глутамату	$34,1 \pm 4,8^{##}$	$2,4 \pm 0,62$	$3,5 \pm 1,03$
Стресс + γ -глобулин	$14,00 \pm 0,66^{**}$	$1,44 \pm 0,73^*$	$2,56 \pm 0,56$
Группа пассивных крыс			
Контроль (введение физ. р-ра)	$10,61 \pm 2,12$	$3,67 \pm 0,99$	$1,17 \pm 0,48$
Стресс	$2,43 \pm 1,06^{**}$	$0,71 \pm 0,47^*$	$1,14 \pm 0,34$
Стресс + антитела к глутамату	$11,09 \pm 3,43^{##}$	$2,0 \pm 0,47$	$2,45 \pm 0,71$
Стресс + γ -глобулин	$3,3 \pm 0,99^{##}$	$0,5 \pm 0,22^*$	$1,3 \pm 0,33$

Примечание. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,01$ по сравнению с контролем; ## — $p < 0,01$ по сравнению с группой стрессированных животных.

Содержание нейромедиаторных аминокислот в нмоль/г ткани в гиппокампе и гипоталамусе поведенчески активных и пассивных крыс (M \pm m)

Таблица 2

Наименование аминокислот	Гиппокамп		Гипоталамус	
	Активные крысы	Пассивные крысы	Активные крысы	Пассивные крысы
Аспартат	$145,40 \pm 12,96$	$148,44 \pm 6,00$	$228,42 \pm 21,82$	$202,14 \pm 10,38$
Глицин	$97,15 \pm 29,89$	$67,14 \pm 5,03$	$83,65 \pm 6,05$	$83,04 \pm 3,50$
Таурин	$28,70 \pm 1,72$	$24,72 \pm 1,16$	$243,50 \pm 22,70$	$207,50 \pm 13,19$

ностью (активные и пассивные) не выявлено. Стрессорное воздействие приводило к неоднозначному изменению содержания нейротрансмиттерных аминокислот в структурах мозга обеих групп крыс. В постстрессорном периоде наблюдали достоверное снижение содержания глицина и значительное (в 6,6 раза) увеличение уровня таурина в гиппокампе активных крыс (рис. 1А). В то же время стрессорное воздействие не оказывало влияния на содержание глицина и таурина в гиппокампе поведенчески пассивных крыс (рис. 1Б). Каких-либо изменений содержания возбуждающей аминокислоты — аспартата в гиппокампе активных и пассивных крыс в постстрессорном

периоде не наблюдали. Стрессорное воздействие не оказывало влияния на содержание аспартата, глицина и таурина в гипоталамусе активных и пассивных животных (рис. 2).

Интраназальное введение антител к глутамату в дозе 250 мкг/кг массы тела сразу после стрессорного воздействия способствовало повышению содержания глицина в 1,5 раза и более выраженному увеличению уровня таурина (в 1,3 раза) в гиппокампе активных крыс по сравнению со стрессированными животными. Введение антител к глутамату поведенчески пассивным крысам, подвергнутым стрессорному воздействию, также приводило к существенному

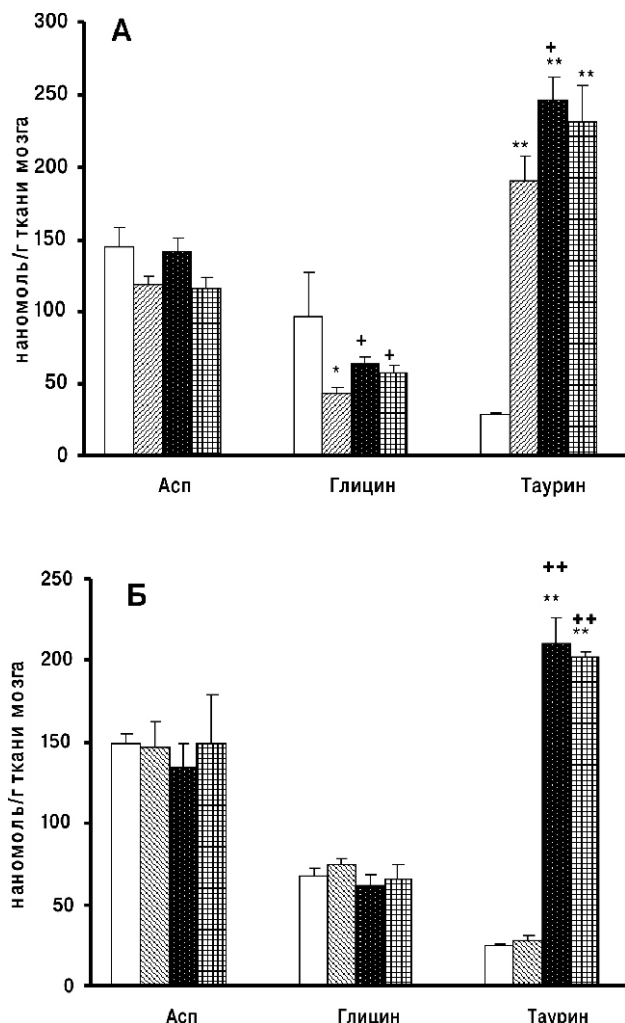


Рис. 1. Влияние антител к глутамату при интраназальном введении на содержание нейромедиаторных аминокислот в гиппокампе активных (А) и пассивных (Б) крыс, подвергнутых комбинированному стрессорному воздействию.

По оси ординат — уровень нейромедиаторных аминокислот в нмоль/г ткани мозга.

Белый столбик — контроль; столбик с косой штриховкой — стресс, темные столбики — антитела к глутамату + стресс, столбики с штриховкой в сетку — γ -глобулин + стресс.

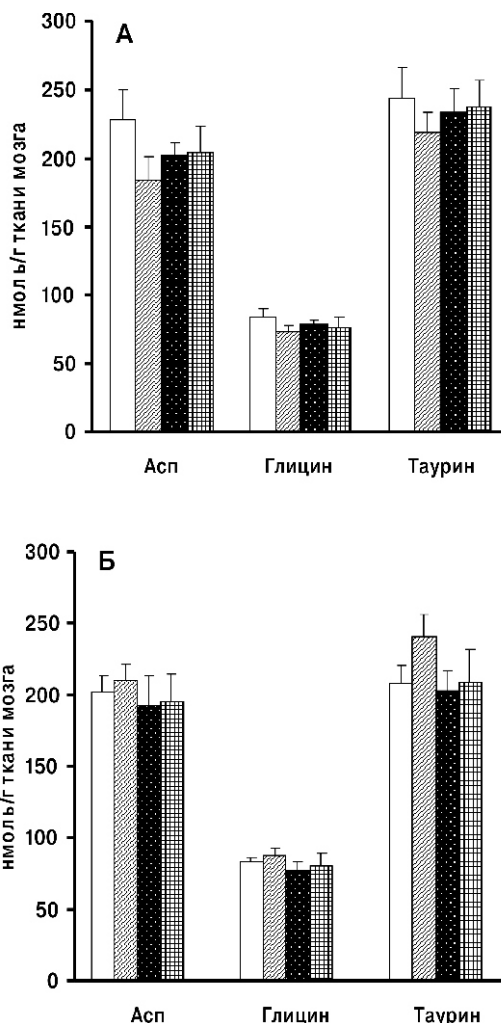


Рис. 2. Влияние антител к глутамату при интраназальном введении на содержание нейромедиаторных аминокислот в гипоталамусе активных (А) и пассивных (Б) крыс, подвергнутых комбинированному стрессорному воздействию.

По оси ординат — уровень нейромедиаторных аминокислот в нмоль/г ткани мозга.

Белый столбик — контроль; столбик с косой штриховкой — стресс, темные столбики — антитела к глутамату + стресс, столбики с штриховкой в сетку — γ -глобулин + стресс.

увеличению (в 7,4 раза) содержания таурина в гиппокампе, но не оказывали влияния на уровень глицина в этой структуре мозга. Интраназальное введение γ -глобулиновой фракции интактного кролика сразу после стресса оказывало сходное с антителами, но менее выраженное изменение содержания аминокислот в структурах мозга активных и пассивных крыс.

Таким образом, проведенные исследования показали, что стрессорное воздействие сопровождалось изменением содержания нейромедиаторных аминокислот в структурах мозга. Наиболее существенные изменения уровней глицина (снижение) и таурина (увеличение) наблюдали в гиппокампе поведенчески активных крыс. Антитела к глутамату при интраназальном введении сразу после стрессорного воздействия способствовали увеличению содержания в гиппокампе поведенчески активных и пассивных крыс тормозных нейромедиаторных аминокислот глицина и таурина, относящихся к стресс-лимитирующим нейромедиаторным системам. Эти изменения совпали с нормализацией поведенческой активности животных в «открытом поле».

Механизм действия антител на ЦНС — это сложный процесс, включающий несколько аспектов. Антитела к нейромедиаторам способны проникать через гематоэнцефалический барьер в ЦНС в количестве достаточном для изменения функциональной активности нервной системы. Это подтверждается результатами, полученными на других экспериментальных моделях, в которых была показана возможность изменения содержания нейромедиаторов и их метаболитов в структурах мозга животных и лигандсвязывающей активности рецепторов нейромедиаторов при разных способах введения антител (активная иммунизация, внутрибрюшинное введение) [33]. Ранее нами была показана возможность восстановления антителами к глутамату содержания нейромедиаторов глутамата, ГАМК и дофамина в гиппокампе крыс, подвергнутых стрессорному воздействию [8]. Исследования методом микродиализа показали, что иммунизация крыс конъюгатом глутамата с бычьим сывороточным альбумином изменяет в дорсальном гиппокампе профиль содержания глутамата и ГАМК в динамике стрессорного воздействия и в постстрессорном периоде [3]. На основании вышеизложенного, можно предположить, что действие антител к глутамату при их интраназальном введении на содержание глицина и таурина в гиппокампе при стрессорном воздействии опосредовано через глутамат- и ГАМК-ергические системы. В опытах на грызунах с фенциклидин-индуцированным поведением был установлен модулирующий эффект глицина на NMDA рецепторы [36]. С помощью электрофизиологической и рецептор-связывающей техники на срезах префронтальной коры

крыс было обнаружено прямое взаимодействие таурина с глутаматными рецепторами [34]. Также было показано, что таурин модулирует синаптическую передачу посредством активации глициновых и ГАМК-А рецепторов [35].

Таким образом, на основании результатов данного и предыдущих исследований, можно предположить, что антитела к глутамату выступают как эндогенные биорегуляторы и предупреждают развитие стресс-реакций.

References

1. Raevskiy K.S., Georgiev V.P. *Mediator amino acids*. Medicine. Moscow. 1986 (in Russian)
2. Sudakov V.K. Individuality of emotional stress. *Zh. Nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2005; 2: 4-12. (in Russian)
3. Umryukhin A.E. Neurotransmitter hippocampal mechanisms of stress behavior and avoidance reactions. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2013; 1. Elektronnyy variant. (in Russian)
4. Moghaddam B. Stress activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex: implications for dopamine-associated psychiatric disorders. *Biol. Psychiatry*. 2002; 51(10): 775.
5. Reznicov LR, Grillo CA, Piroli GG, Pasumarthi RK, Reagan LP, Fadel J. Acute stress-mediated increases of extracellular glutamate levels in the rat amygdala: differential effects of antidepressant treatment. *Eur. J. Neurosci*. 2007; 25(10): 3109-14.
6. Shao Y., Yan G., Xuan Y., Peng H., Huang QJ, Wu R., Xu H. Chronic social isolation decreases glutamate and glutamine levels and induces oxidative stress in the rat hippocampus. *Behav. Brain Res*. 2015; 282(1): 201-8.
7. Knox D., Perrine SA, George SA, Galloway MP, Liberzon I. Single prolonged stress decreases glutamate, glutamine, and creatine concentration in the rat medial prefrontal cortex. *Neurosci. Lett*. 2010; 480(1): 16-20.
8. Vetrile L.V., Zakharova I.A., Kudrin V.S., Klodt P.M. Neuromodulating influence of antibodies to glutamate in the behavioral response and the level of neurotransmitters in the central nervous system in rats during immobilization stress. *Patogenez*. 2012; 10(3): 3940. (in Russian)
9. Umryukhin A.E., Chekmareva N.Yu., Vetrile L.A., Zakharova I.A. Emotsionalny Stress on the background of immunization with conjugates neurotransmitter — BSA. *Patogenez*. 2014; 12(3): 68-9. (in Russian)
10. Kazi Al, Oomen A. Chronic noise stress-induced alterations of glutamate and gamma-aminobutyric acid and their metabolism in the rat brain. *Noise Health*. 2014; 16(73): 343-9.
11. Hasler G., van der Veen J.W., Grillon C., Shen J. Effect of acute psychological stress on prefrontal GABA concentration determined by proton magnetic resonance spectroscopy. *Am.J.Psychiatry*. 2010; 167(10): 1226-31.
12. Garaeva OI. Sulfur containing amino acids as markers of stress state. *Buletinul ASM. Stiintele vetii*. 2011; 3: 315.
13. Meerson F.Z. Patogenez And Prejudice stress and ischemic heart damage. Moscow. Meditsina. 1984. (in Russian)
14. Umryukhin A.E., Chekmareva N.Yu., Sotnikov S.V., Vetrile L.A., Zakharova I.A. Micro dialysis study content of glutamate and GABA in the dorsal hippocampus of rats im-

munized with conjugate glutamate-bovine serum albumin. *Neurologicheskiy vestnik*. 2013; 45(1): 27-33. (in Russian)

15. De Groote L, Linthorst AC. Exposure to novelty and forced swimming evoke stressor-dependent changes in extracellular GABA in the rat hippocampus. *Neuroscience*. 2007; 148: 794-805.

16. Chang L, Cloak CC, Ernst T. Magnetic resonance spectroscopy studies of GABA in neuropsychiatric disorders. *J Clin Psychiatry*. 2003; 64 (suppl 3): 7-14.

17. Khukho F. *Neurochemistry. Fundamentals and principles*. Moskva. Mir.1990.

18. Dambinova S.A., Kamenskaya M.A. Molecular mechanisms of momentum transfer in the membranes of neurons. Ion channels. *Neurochemistry*. Redaktsiya I.P. Ashmarina i P.V. Strukalova. Moskva. Izd. Institut biomeditsinskoy khimii RAMN. 1996: 246-98. (in Russian)

19. Savchenko V.N., Nikolenko E.Ya., Kratenko A.S., Pilipenko N.O. Stress-protective effect of glycine in experimental immobilization. *Problemi bespereryvnoy medichnoy osviti ta nauki*. 2014; 1: 68-71. 9. (in Russian)

20. Oshchepkova O.M., Seminskiy I.Zh., Malyshev V.V. Effect of glycine analogs on stress response mechanisms. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)*. 2003; 39 (4): 11-6. (in Russian)

21. Fushun Wang, Cheng Xiao, Jiang Hong Ye J. Taurine activates excitatory non-synaptic glycine receptors on dopamine neurons in ventral tegmental area of young rats *J. of Physiol*. 2005; 565(2): 503.

22. Saransaari P, Oja SS. Taurine and neural cell damage. *Amino Acids*. 2000; 19(3-4):509-26.

23. Chen WQ, Jin H, Nguyen M, Carr J, Lee YJ, Hsu CC, Faiman MD, Schloss JV, Wu JY. Role of taurine in regulation of intracellular calcium level and neuroprotective function in cultured neurons. *J Neurosci Res*. 2001; 66(4):612-9.

24. Del Olmo N, Galarreta M, Bustamante J, Martin Del Rio R, Solis JM. Taurine-induced synaptic potentiation: role of calcium and interaction with LTP. *Neuropharmacology*. 2000; 39(1):40-54.

25. Nguyen TT, Bhattarai JP, Park SJ, Han SK. Activation of glycine and extrasynaptic GABA(A) receptors by taurine on the substantia gelatinosa neurons of the trigeminal subnucleus caudalis. *Neural Plast*. 2013; 2013: 740581.

26. Danielyan M.A., Sarkisyan Dzh.S., Chavushyan E.A., Savayan A.A., Nazaryan O.A., Melkonyan N.N. Electrophysiological study of the effect of acute stress and the protector influence of taurine on activity of neurons in the

amygdala after acute immobilization stress. *Meditsinskaya nauka Armenii NAN RA*. 2015; 55 (1): 54-63. (in Russian)

27. Evseev V.A., Vetrile L.A., Smirnova V.S., Grafova V.N., Zakharova I.A., Trekova N.A., Kukushkin M.L. Autoantibodies to glutamate, GABA, norepinephrine in the mechanisms of neuropathic pain. *Byul. eksper. biol. i med*. 2008;145 (5): 521-24. (in Russian)

28. Vetrile L.A., Karpova M.N., Kuznetsova L.V., Klishina N.Yu. Autoantibodies to neurotransmitters serotonin, dopamine, GABA and glutamate in the in the dynamics development of chronic epileptization Mice C57Bl/6 brain. *Patogenez*. 2010; 8 (1):33-4. (in Russian)

29. Vetrile L.A., Umryukhin E.A., Kravtsov A.N., Sotnikov S.V., Zakharova I.N. Autoantibodies to neurotransmitters at psycho-emotional stress syndrome. *Patogenez*. 2008; 6(2): 38. (in Russian)

30. Pshennikova M.G., Bondarenko N.A., Shimkovich M.V. Nitrogen nitric oxide as a factor genetically determined resistance to the stressor damage and adaptive protection. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2001; 132 (11): 510. (in Russian)

31. Borodkina L.E., Kudrin V.S., Klodt P.M., Narkevich V.B., Tyurenkov I.N. Phenibut Influence on content of monoamines and their metabolites, as well as amino acid neurotransmitter in rat brain structures *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2009; 72(1): 60-3. (in Russian)

32. Trekova N.A., Vetrile L.A. Effect of systemic administration of antibodies to glutamate on mice C57Bl/6 and BALB/C behavior indicators. *Zhurnal Vysshey nervnoy deyateli'nosti*. 2004; 54(3): 405-9. (in Russian)

33. Evseev V.A. *The antibodies to neurotransmitters in mechanisms neyroimmunopatology*. M. Izdatel'stvo RAMN. 2007. (in Russian)

34. Chan CY, Sun HS, Shas SM, Agjvic MS, Ho I, Friedman E et al. Direct interaction of taurine with the NMDA glutamate receptor subtype via multiple mechanisms. *Eur. J. Pharmacol*. 2014; 728(5): 167-75.

35. Wu J., Kohno T., Georgiev SK, Ikoma M., Ishii H., Petrenco AB, Baba H. Taurine activates glycine and gamma-aminobutyric acid A receptors in rat substantia gelatinosa neurons. *Neuroreport*. 2008; 19(3): 333-7.

36. Linn GS., O'Keefe RT., Lifshitz K., Schrorder C., Javitt DC. Behavioral effects of orally administered glycine in socially housed monkeys chronically treated with phencyclidine. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007; 192(1): 27-38.

Поступила 15.02.15

Сведения об авторах:

Захарова Ирина Александровна, к.б.н., ст. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ «НИИОПП»

Кудрин Владимир Сергеевич, к.м.н. зав. лаб. нейрохимической фармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»

Панкова Н.Б., Лебедева М.А., Хлебникова Н.Н., Карганов М.Ю.

Возрастные изменения латентных периодов простой сенсомоторной реакции на световой стимул у мужчин и женщин с разным индексом массы тела

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

Проведено изучение взаимосвязи латентного периода простой сенсомоторной реакции на световой стимул и индекса массы тела (ИМТ) у мужчин и женщин в возрасте 30–60 лет ($n = 507$). Границей между низким (ниже $Me - 1SD$) и средним (от $Me - 1SD$ до $Me + 1SD$) значением ИМТ стала величина $22,74 \text{ кг/м}^2$, границей между средними и высокими (выше $Me + 1SD$) значениями ИМТ — $33,16 \text{ кг/м}^2$. Показано, что с возрастом происходит возрастание доли людей с высокими значениями ИМТ, причём более быстро и выражено — у женщин. Латентность сенсомоторной реакции на световой стимул не меняется у мужчин, и снижается с возрастом у женщин. Однако полученные нами данные свидетельствуют о том, что развивающееся с возрастом алиментарное ожирение не оказывает негативного влияния на нейрофизиологические показатели сенсомоторной реактивности.

Ключевые слова: индекс массы тела; латентный период сенсомоторной реакции; взрослые.

Для цитирования: Панкова Н.Б., Лебедева М.А., Хлебникова Н.Н., Карганов М.Ю. Возрастные изменения латентных периодов простой сенсомоторной реакции на световой стимул у мужчин и женщин с разным индексом массы тела. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016; 60(1): 11–16.

Pankova N.B., Lebedeva M.A., Khlebnikova N.N., Karganov M.Yu.

Age-related changes of the latent period of simple sensorimotor reaction to the light stimuli in both men and women with different body mass index

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

The study of the relationship of the latent period of simple sensorimotor reaction to the light stimulus and body mass index (BMI) in males and females aged 30–60 years ($n = 507$) was done. The boundary between the low (below $Me - 1SD$) and middle (from $Me - 1SD$ to $Me + 1SD$) BMI was the value of 22.74 kg/m^2 , the boundary between the middle and high (above $Me + 1SD$) BMI — 33.16 kg/m^2 . It is shown that there is an increase in the proportion of people with high BMI with age (faster and more pronounced — in women). Sensorimotor reaction latency to the light stimuli does not change in men, and declines with age in women. However the data obtained indicate that developed with age alimentary obesity does not adversely affect neurophysiological parameters of the sensorimotor reactivity.

Keywords: body mass index; sensorimotor reaction latency; adults

For citation: Pankova N.B., Lebedeva M.A., Khlebnikova N.N., Karganov M.Yu. Age-related changes of the latent period of simple sensorimotor reaction to the light stimuli in both men and women with different body mass index. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2016; 60(1): 11–16. (in Russian).

For correspondence: Pankova N.B., e-mail: nbpankova@gmail.com

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

В последние годы эпидемия алиментарного ожирения охватывает всё большее число стран мира, все слои населения и все возрастные группы [1]. Изменения социально-экономических условий жизни часто провоцируют формирование эмоциональных расстройств с индукцией нарушений пищевого поведения

[2], и даже развития психогенной булимии [3]. При этом ряд исследователей склонны делать вывод о связи высоких значений индекса массы тела (ИМТ) с недостаточностью интеллектуальных возможностей. Так, приводятся доказательства того, что высокие величины ИМТ на протяжении жизни являются пре-

диктором когнитивных проблем в старости [4], а снижение после 40 лет когнитивных способностей у людей с ожирением происходит гораздо быстрее, чем при нормальных величинах ИМТ [5]. Объективные количественные методы МРТ выявили негативную корреляционную связь между количеством висцеральной жировой ткани с одной стороны, и показателями словесной памяти и произвольного внимания, и объёмными показателями гиппокампа и левого желудочка — с другой [6].

Вместе с тем, существуют данные об отсутствии связи между наличием ожирения и когнитивными способностями после 80 лет [7]. Наоборот, в позднем онтогенезе показано, что умеренное повышение ИМТ положительно коррелирует с активацией мышления и расширением когнитивных возможностей [8]. Расширенные исследования последних лет также опровергают тезис о негативном влиянии ожирения на интеллектуальные способности детей и подростков [9], хотя низкий интеллект в возрасте 11 лет является предиктором ожирения в старости [7].

С другой стороны, известно, что с возрастом происходит ухудшение сенсорного восприятия. Причём в данном контексте речь идёт не о снижении зрения или слуха, а об объективных нейрофизиологических показателях, например, о возрастном затягивании латентности и снижении амплитуды акустического вызванного потенциала P300 [10]. Также с возрастом происходит нарушение психомоторной координации и снижение реактивности на стимулы разной модальности, что в частности проявляется нарушением походки [11]. Ранее нами показано, что показатели психомоторики корреляционно связаны с показателями обмена веществ, определяемыми методом лазерной корреляционной спектроскопии [12].

Цель исследования — изучение возрастной динамики ИМТ (на выборке жителей Москвы) и параметров сенсомоторной координации, оцениваемых в инструментальных двигательных тестах, и связей между ними.

Методика

В работе использованы данные обследований функционального состояния организма взрослых работающих жителей Москвы — работников производственной сферы, учителей общеобразовательных школ, преподавателей колледжей, научных сотрудников. В статистический анализ были взяты результаты испытуемых в возрасте 30—60 лет, 131 мужчины и 376 женщин, всего 507 чел. Из них в возрасте 30—40 лет ($n = 127$) — 35 мужчин и 92 женщины, в возрасте 41—50 лет ($n = 206$) — 50 мужчин и

156 женщин, в возрасте 51—60 лет ($n = 174$) — 46 мужчин и 128 женщин.

Измерения длины и массы тела проводили по стандартным гигиеническим правилам (точность измерения для длины тела составляла $\pm 0,5$ см, для массы тела ± 100 г), с последующим расчётом ИМТ ($\text{ИМТ} = \text{масса (кг)} / \text{длина тела}^2 (\text{м}^2)$).

Измерения латентных периодов простой сенсомоторной реакции проводили на приборе «компьютерный измеритель движений» — КИД-3 [13, 14]. В программе КИД-3 предусмотрена возможность регистрации латентных периодов реакций как на световой, так и на звуковой стимулы. Однако для достижения целей данной работы мы отдали предпочтение работе со световыми стимулами, менее подверженными физико-химическим влияниям внешней среды и психоэмоционального состояния самого человека, чем звуковые стимулы [15]. Процедура тестирования заключалась в следующем: в ответ на вспышку светодиода испытуемый должен был совершить максимально быстрое смещение рычага прибора (отведение руки), и затем вернуть курсор в исходное положение. Измеряемым параметром являлось начало движения рычага («время реакции на свет» — ВРС), точность измерения составляла 1 мс. Тест выполнялся обеими руками по очереди, очередность рук определял сам испытуемый. Для каждой руки предъявляли по 10 стимулов длительностью 0,4 с, интервал между стимулами изменялся в случайном режиме от 2 до 4 с. Длительность теста для каждой руки не превышала 30 с. В статистический анализ по каждому человеку брали усреднённые по 10 реализациям ВРС для левой руки (ВРСл), для правой руки (ВРСп), и в среднем (для каждого испытуемого $\text{ВРС}_{\text{ср}} = (\text{ВРСл} + \text{ВРСп}) / 2$).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета Statistica 6.0 (StatSoft). Поскольку распределения показателей ИМТ и ВРС не соответствовали нормальным (по рекомендуемому для больших выборок критерию Шапиро—Вилкса), в работе были использованы непараметрические критерии: Манн—Уитни для парных сравнений, Краскелл—Уоллеса — для множественных сравнений. Частотные показатели сравнивали по двустороннему критерию χ^2 .

Результаты и обсуждение

По существующей клинической практике границей повышенных величин ИМТ считается 25 кг/м^2 , а границей ожирения — 30 кг/м^2 . Представленные граничные величины соответствуют 85-му и 95-му центилям распределений величины ИМТ у белых американцев в возрасте 19 лет, построенных на осно-

вании данных 1971—1974 гг. [16]. Анализ распределения ИМТ в нашей выборке показал, что считающиеся нормальными величины ИМТ встречаются не более чем в 43% случаев в возрасте 30—40 лет, и не более чем в 24% случаев в возрасте 51—60 лет (рис. 1). При этом выявлено, что у женщин избыток массы тела появляется раньше, чем у мужчин, и гораздо чаще переходит в стадию алиментарного ожирения. Эти результаты согласуются с данными официальной статистики ВОЗ за 2014 г.: 39% людей в возрасте 18 лет и старше имеют избыточный вес (ИМТ >25 кг/м², а 13% страдают от ожирения (ИМТ >30 кг/м²) [1].

В сложившейся ситуации мы воспользовались рекомендациями ВОЗ для расчёта норм ИМТ [16]: нормальные величины лежат в диапазоне от Me — 1SD до Me + 1SD, где Me — медиана, SD — стандартное отклонение анализируемой выборки. В нашем исследовании (суммарно мужчины и женщины 30—60 лет, n = 507) медиана составила 27,95 кг/м² (что близко к данным ВОЗ для соответствующих возрастных диапазонов [1]), границей между низким и средним значением ИМТ стала величина 22,74 кг/м², границей между средними и высокими значениями ИМТ — 33,16 кг/м². Согласно такому распределению нашей выборки, группа испытуемых с низкими значениями ИМТ (n = 77) включала 60 женщин и 17 мужчин, группа со средними значениями ИМТ (n = 343) включала 238 женщин и 105 мужчин, группа с высокими значениями ИМТ (n = 87) включала 78 женщин и 9 мужчин.

Анализ второго параметра — сенсомоторной реактивности на световой стимул — показал, что существуют различия в показателях женщин и мужчин во всех возрастных диапазонах (рис. 2). Кроме того, возрастная динамика в виде замедления реакции на световой стимул наблюдается только у женщин (тест Краскелл—Уоллеса : Н (2, n = 376) = 9,710 ρ = 0,008). Аналогичные закономерности выявлены и другими авторами с использованием других инструментальных методов оценки ВРС [11].

Особенности распределения рассматриваемой выборки по величинам ИМТ и ВРС позволили предположить наличие связи между ИМТ и латентным периодом сенсомоторных реакций. Оценка параметров телосложения и сенсомоторной реактивности у женщин и мужчин в зависимости от ИМТ показала следующее.

Анализ антропометрических данных показал, что, во-первых, статистически значимые различия по величине ИМТ (рис. 3, А) выявляются как для мужчин (тест Краскелл—Уоллеса: Н (2, n = 131) = 62,745, ρ = 0,000) и женщин (Н (2, n = 376) = 275,031, ρ = 0,000) по отдельности, так

для выборки в целом (Н (2, n = 507) = 344,998, ρ = 0,000). Во-вторых, несмотря на различия между полами по длине тела внутри каждой из групп (рис. 3, Б), межгрупповые (по ИМТ) различия не выявлены ни для мужчин, ни для женщин. В-третьих, несмотря на половой диморфизм по массе тела в каждой из групп (рис. 3, В), наблюдаются межгрупповые (по ИМТ) различия как для мужчин Н (2, n = 131) = 52,637, ρ = 0,000) и женщин (Н (2, n = 376) = 242,297, ρ = 0,000) по отдельности, так для выборки в целом (Н (2, n = 507) = 263,958, ρ = 0,000).

По латентным периодам сенсомоторной реактивности на световой стимул использованные методы статистического анализа не выявили межгрупповых

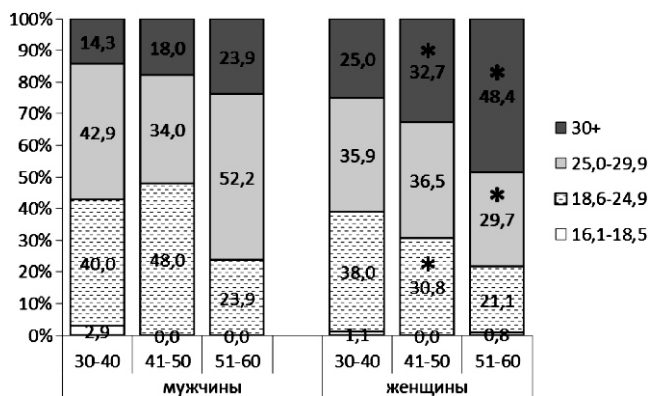


Рис. 1. Распределения мужчин и женщин разного возраста (возрастные интервалы указаны по оси абсцисс) в зависимости от величины ИМТ. Статистическая значимость различий между мужчинами и женщинами одного возраста (p<0,05 по двустороннему критерию χ²) обозначена звёздочкой.

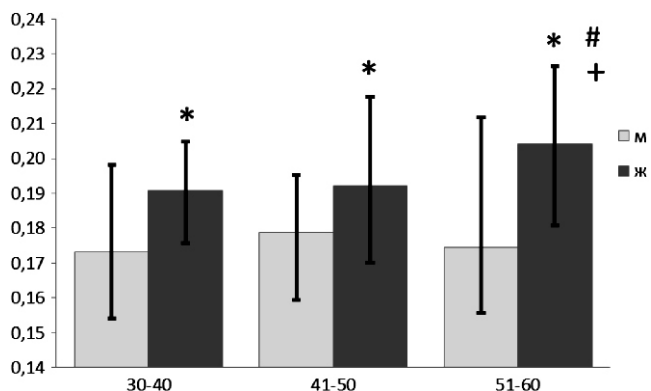


Рис. 2. Средние величины латентных периодов простой сенсомоторной реакции на световой стимул (Me; Q1—Q3) у мужчин и женщин разного возраста (возрастные интервалы указаны по оси абсцисс). Статистическая значимость различий между мужчинами и женщинами одного возраста: * — p<0,05 по непараметрическому критерию Манн—Уитни, статистическая значимость различий между возрастными группами (p<0,05 по критерию Краскелл—Уоллеса): # — отличия от возраста 30—40 лет; + — отличия от возраста 41—50 лет.

различий между объединёнными выборками (рис. 4, справа) — ни для левой, ни для правой руки. Аналогичные закономерности выявлены для женщин из разных (по ИМТ) групп. Однако у мужчин со средними и высокими величинами ИМТ, показатели ВРС, во-первых, были более низкими, чем у женщин, особенно для правой руки (рис. 4, Б). Во-вторых, для правой руки выявлено наличие тенденции к снижению ВРС при возрастании ИМТ (рис. 4, Б), что также воспроизвелось при анализе усреднённых величин ВРС_{пр} (рис. 4, В). К сожалению, немногочисленность выборки мужчин с высоким ИМТ (n = 9) не позволяет сделать более определённые выводы.

рых, для правой руки выявлено наличие тенденции к снижению ВРС при возрастании ИМТ (рис. 4, Б), что также воспроизвелось при анализе усреднённых величин ВРС_{пр} (рис. 4, В). К сожалению, немногочисленность выборки мужчин с высоким ИМТ (n = 9) не позволяет сделать более определённые выводы.

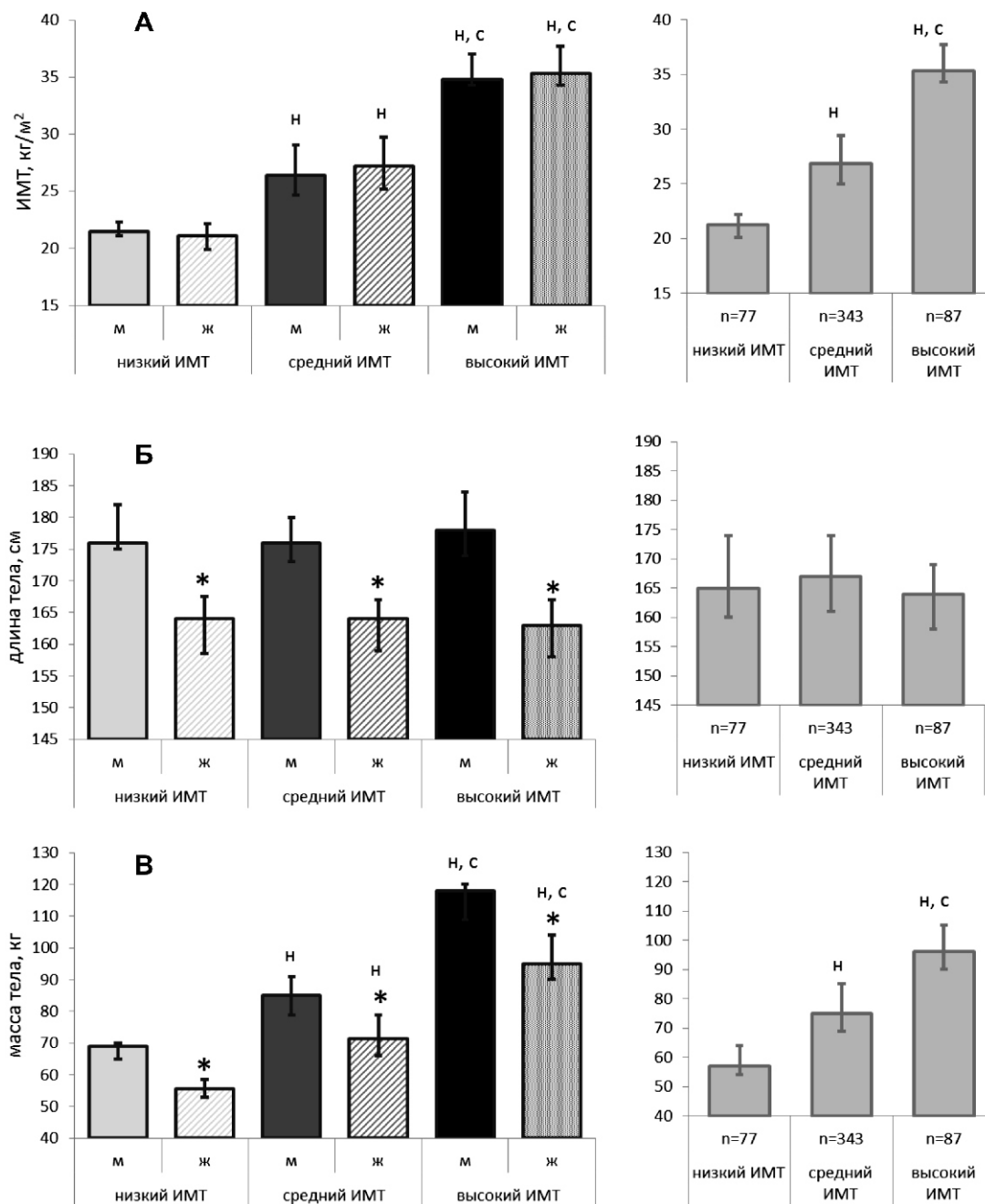


Рис. 3. ИМТ (А), длина (Б) и масса тела (В) у испытуемых с разным уровнем ИМТ (Ме; Q1–Q3). Слева — у мужчин (м) и женщин (ж), справа — в объединённых выборках. Статистическая значимость различий между мужчинами и женщинами (по непараметрическому критерию Манн–Уитни): * — $p < 0,05$. Отличия от группы «низкий ИМТ» ($p < 0,05$ по критерию Краскелл–Уоллеса) обозначены буквой «н», от группы «средний ИМТ» — буквой «с».

Заключение

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что развивающееся с возрастом алиментарное ожирение не оказывает негативного влияния на нейрофизиологические показатели сенсомоторной реактивности. Тогда патофизиологическим механизмом описываемых в литературе данных о возрастном снижении когнитивных процессов могут быть нару-

шения внутримозговых процессов анализа информации, в частности — дефицит рабочей памяти [17]. Моторные нарушения могут быть обусловлены нарушениями координации в работе рук, развивающимися гораздо раньше и в большей степени, чем нарушения в управлении одной конечностью [18]. При этом когнитивные и моторные нарушения могут развиваться независимо, по разным причинам и разным патофизиологическим механизмам [19].

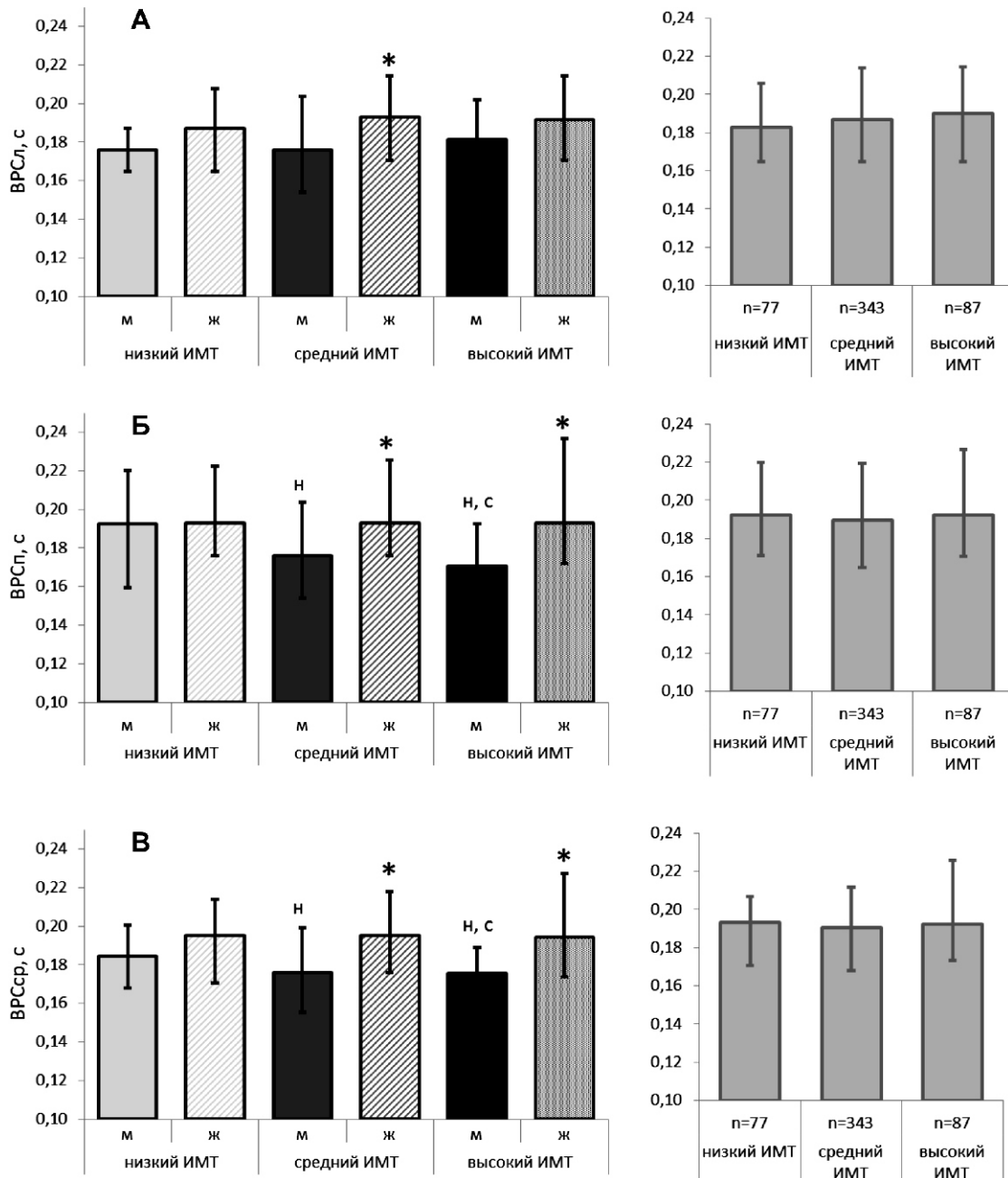


Рис. 4. ВРСл (А), ВРСп (Б) и ВРСср (В) у испытуемых с разным уровнем ИМТ (Ме; Q1–Q3). Слева — у мужчин и женщин, справа — в объединённых выборках. Обозначения статистической значимости — как на рис. 3.

Патофизиологические механизмы возрастных когнитивных нарушений могут включать также эмоциональные расстройства, вызванные жизненными обстоятельствами, и проявляющиеся в виде нарушений пищевого поведения с предсказуемым повышением ИМТ [2]. Нельзя игнорировать и генетическую предрасположенность: показано, что более низкие объёмные показатели гиппокампальной ткани у людей с ожирением не исчезают после коррекции массы тела [6]. Есть также предположение, что возрастное повышение массы тела у женщин может быть связано с накоплением ряда микроэлементов [20].

References

1. WHO Global Infobase. URL: <https://apps.who.int/infobase/Indicators.aspx>.
2. Sagardoy C.R., Morales G.L.T., Ostolaza S.G. et al. Emotional processing in adult vs adolescent patients with eating behavior disorders; emotional recognizing and the mental theory. *Nutr Hosp.* 2014; 29(4): 941-52. doi: 10.3305/nh.2014.29.4.7326. (Article in Spanish)
3. Dejong H., Van den Eynde F., Broadbent H. et al. Social cognition in bulimia nervosa: a systematic review. *Eur. Psychiatry.* 2013; 28(1): 1-6. doi: 10.1016/j.eurpsy.2011.07.002.
4. Sabia S., Kivimaki M., Shipley M.J. et al. Body mass index over the adult life course and cognition in late midlife: the Whitehall II Cohort Study. *Am. J Clin. Nutr.* 2009; 89(2): 601-7. doi: 10.3945/ajcn.2008.26482.
5. Singh-Manoux A., Czernichow S., Elbaz A. et al. Obesity phenotypes in midlife and cognition in early old age: the Whitehall II cohort study. *Neurology.* 2012; 79(8): 755-62. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182661f63.
6. Isaac V., Sim S., Zheng H. et al. Adverse Associations between Visceral Adiposity, Brain Structure, and Cognitive Performance in Healthy Elderly. *Front Aging Neurosci.* 2011; 3: 12. doi: 10.3389/fnagi.2011.00012. eCollection 2011.
7. Aslan A.K., Starr J.M., Pattie A., Deary I. Cognitive consequences of overweight and obesity in the ninth decade of life? *Age Ageing.* 2015; 44(1): 59-65. doi: 10.1093/ageing/afu108.
8. Santos N.C., Costa P.S., Cunha P. et al. Clinical, physical and lifestyle variables and relationship with cognition and mood in aging: a cross-sectional analysis of distinct educational groups. *Front Aging Neurosci.* 2014; 6: 21. doi: 10.3389/fnagi.2014.00021. eCollection 2014.
9. Martin A., Saunders D.H., Shenkin S.D., Sproule J. Lifestyle intervention for improving school achievement in overweight or obese children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014; 3:CD009728. doi: 10.1002/14651858.CD009728.pub2.
10. vanDinteren R., Arns M., Jongsma M.L., Kessels R.P. P300 development across the lifespan: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2014; 9(2):e87347. doi: 10.1371/journal.pone.0087347. eCollection 2014.
11. Callisaya M.L., Blizzard L., Schmidt M.D. et al. A population-based study of sensorimotor factors affecting gait in older people. *Age Ageing.* 2009; 38(3): 290-5. doi: 10.1093/ageing/afp017.
12. Lebedeva M.A., Khlebnikova N.N., Arkhipova E.N. et al. Study of functional activity of psychomotor processes and the nature of metabolism regulation for physiological development rates of children objective registration. *Pathogenesis.* 2012; 10(2): 32-8. (In Russian)
13. Pankova N.B., Lebedeva M.A., Slezko V.N. et al. Psychomotor coordination and sensory-motor reactivity in patients with vertebral pathology. *Pathogenesis.* 2003; 1(1): 86-9. (In Russian)
14. Pankova N.B., Lebedeva M.A., Cherepov A.B., Karganov M.Yu. Evaluation of psychomotor integration parameters with KID-3 device for prenosological diagnostics of motor disorders in the late ontogenesis. *Pathogenesis.* 2015; 13(1): 48-53. PMID: 22891552 (In Russian)
15. Khorseva N.I., Grigor'ev Yu.G., Gorbunova N.V. Changes in the parameters of the simple auditory-motor response in children users of mobile communication: longitudinal study. *Radiats. Biol. Radioecol.* 2012; 52(3): 282-92. (In Russian)
16. Must A., Dallal G.E., Dietz W.H. Reference data for obesity: 85th and 95th percentiles of body mass index (wt/ht²) and triceps skinfold thickness. *Am. J Clin. Nutr.* 1991; 53: 839-46. PMID: 2008861
17. Pinal D., Zurrón M., Diaz F. Age-related changes in brain activity are specific for high order cognitive processes during successful encoding of information in working memory. *Front Aging Neurosci.* 2015; 7:75. doi: 10.3389/fnagi.2015.00075. eCollection 2015.
18. Hoff M., Trapp S., Kaminski E. et al. Switching between hands in a serial reaction time task: a comparison between young and old adults. *Front Aging Neurosci.* 2015; 7:176. doi: 10.3389/fnagi.2015.00176. eCollection 2015.
19. Cai L., Chan J.S., Yan J.H., Peng K. Brain plasticity and motor practice in cognitive aging. *Front Aging Neurosci.* 2014; 6:31. doi: 10.3389/fnagi.2014.00031. eCollection 2014.
20. Skalnaya M.G., Tinkov A.A., Demidov V.A., Serebryansky E.P., Nikonov A.A., Skalny A.V. Hair ultra-trace elements in relation to age and body mass index in adult women. *J. Elem.* 2016; 21(1): 211-20. DOI: 10.5601/jelem.2015.20.3.924

Поступила 15.11.15

Сведения об авторах:

Панкова Наталья Борисовна — доктор биол. наук, доц., гл.н.с. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии, nbrankova@gmail.com

Лебедева Марина Андреевна — кандидат биол. наук, вед.н.с. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии, ma_lebedeva@mail.ru

Хлебникова Надежда Николаевна — кандидат биол. наук, вед.н.с. лаб. общей патологии нервной системы, panikh@yandex.ru

Карганов Михаил Юрьевич — доктор биол. наук, проф., зав. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии, mkarganov@mail.ru

Конопля А.И., Шульгинова А.А.

Хроническая ишемия головного мозга: состояние структурно-функциональных свойств эритроцитов

ГБОУ ВПО Курский государственный медицинский университет Минздрава России, 305041, г. Курск, ул. К.Маркса, 3

Цель исследования — выявление изменений структурно-функциональных свойств эритроцитов периферической крови у пациентов с хронической ишемией головного мозга.

Методика. Эритроциты получали из 5 мл гепаринизированной крови, определяли их сорбционную способность (ССЭ) и сорбционную емкость их гликокаликса (СЕГ). Липиды мембран эритроцитов определяли методом тонкослойной хроматографии, электрофорез белков — по [15], белки окрашивали Кумаси голубым R-250. Для оценки выраженности процессов ПОЛ определяли в эритроцитах содержание ацилгидропероксидов и малонового диальдегида. Определяли общую антиокислительную активность, активность каталазы и супероксиддисмутазы (СОД).

Результаты. Выявлено развитие внутриэритроцитарного «окислительного стресса», снижение сорбционной способности эритроцитов, изменение в мембране клеток соотношения фракций липидов за счет уменьшения содержания глицерофосфолипидов и сфингомиелина, увеличения лизофосфатидилхолина, холестерина. Установлено изменение представительности мембранных белков, ответственных за структурообразование и стабилизацию мембраны эритроцитов, формирование, гибкость мембраны и внутриклеточный метаболизм. Отмечена важная роль эритроцитов при хронической ишемии головного мозга, основанная на концепции их участия в цепи приспособительных механизмов, поддерживающих гомеостаз.

Ключевые слова: хроническая ишемия мозга, эритроциты, фосфолипиды и белки мембраны

Для цитирования: Конопля А.И., Шульгинова А.А. Хроническая ишемия головного мозга: состояние структурно-функциональных свойства эритроцитов. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016; 60(1): 17–22 .

Konoplya A.I., Shulginova A.A.

Chronic ischemia of the brain: state structurally functional properties of erythrocytes

Kursk State Medical University, 305041, Kursk, K. Marx St., 3

At patients with a chronic ischemia of a brain against an idiopathic hypertension of the II stage development intra erythrocyte «an oxidative stress», depression of sorption ability of erythrocytes, change in a membrane of cells of a ratio of fractions of lipids due to decrease of the maintenance of glitserophospholipid and a sphingomyelin, augmentation of a lizophosphatidilkholin, cholesterol is taped. Change of presentability of the membranous proteins responsible for structurization and stabilization of a membrane of erythrocytes, a shaping, flexibility of a membrane and an intracellular metabolism is established. The important role of erythrocytes at a chronic ischemia of a brain based on the concept of their participation in a chain of the adaptive mechanisms supporting a homeostasis is noted.

Keywords: chronic ischemia of a brain, erythrocytes, phospholipids and proteins of a membrane.

For citation: Konoplya A.I., Shulginova A.A. Chronic ischemia of the brain: state structurally functional properties of erythrocytes. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2016; 60(1): 17–22. (in Russian)

For correspondence: Konoplya A.I., e-mail: konoplya51@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Развитие цереброваскулярной патологии определяется во многом формированием микро- и макроангиопатий, приводящих к развитию метаболических и гемодинамических нарушений. Диффузное поражение

мелких артерий у больных с хроническими формами недостаточности мозгового кровообращения сопровождаются широким спектром изменений в головном мозге. Поражение головного мозга характеризуется

Для корреспонденции: Конопля Александр Иванович, доктор мед. наук, проф., заслуженный деятель науки РФ, зав. каф. биологической химии Курского государственного медицинского университета, e-mail: konoplya51@mail.ru

постепенным накоплением ишемических и вторичных дегенеративных изменений, обусловленных повторяющимися ишемическими эпизодами в различных сосудистых бассейнах и прежде всего зонах кровоснабжения мелких пенетрирующих мозговых артерий и артериол. Одной из наиболее распространенных форм сосудистого поражения головного мозга у лиц среднего и особенно пожилого возраста является хроническая ишемия головного мозга (ХИМ), или дисциркуляторная энцефалопатия [1, 2].

Эволюция от отдельных клеток к многоклеточным организмам потребовала развитие систем транспорта питательных веществ, регуляторных молекул и кислорода. Потребность в надежном и постоянном снабжении тканей большим количеством различных молекул удовлетворяется разными способами. В организме позвоночных важную роль в этом процессе играют специализированные клетки (эритроциты), осуществляющие газотранспортную функцию за счет приспособленного для этой цели белка гемоглобина и переносящие биологически активные соединения (аминокислоты, пептиды, нейромедиаторы, гормоны, цитокины иммунной системы) в сорбированном на поверхностной структуре мембраны виде или в форме включений в билипидный матрикс мембраны. Таким образом, эритроцит является универсальной транспортной системой позвоночных [3].

Выполнение эритроцитом транспортных функций требует от этой клетки соответствия определенным характеристикам. К ним в первую очередь относится способность к относительно длительному сохранению структурной и функциональной целостности мембраны, способность к сохранению высокой концентрации и функциональной полноценности гемоглобина, к поддержанию функционально обоснованного взаимодействия между различными формами гемоглобина и структурами клеточной мембраны, способность к сохранению формы клетки и ее обратимой деформируемости, позволяющие эритроциту быстро перемещаться в сосудистых и межклеточных пространствах и эффективно доставлять клеткам кислород и другие соединения. Сохранение структуры эпителиев и их архитектоники является необходимым условием эффективного взаимодействия с различными клетками организма. Последнее обуславливает участие эритроцитов в регуляции различных биохимических процессов и физиологических функций. Наряду с сохранением стабильности указанных параметров, эритроцит должен быть способен к обратимому изменению их в определенных пределах в постоянно флуктуирующих условиях внешней для этой клетки среды. Реализация всех указанных особенностей эритроцитов обеспечивается составом и структурой их мембраны и своеобразием, протекающих в них биохимических

процессов, обеспечивающих целостность клеток и выполнение ими транспортных и регуляторных функций [4, 5].

В патогенезе ХИМ большое значение имеет активация перекисного окисления липидов, иммунологическая и эндотелиальная дисфункция, воспаление [1, 2, 6, 7, 8]. Немногочисленность данных о структурно-функциональных свойствах эритроцитов в условиях неврологической патологии [9], в частности при ХИМ, предопределяет целесообразность изучения их участия в патогенезе данного заболевания.

Цель исследования — выявление изменений структурно-функциональных свойств эритроцитов периферической крови у пациентов с хронической ишемией головного мозга.

Методика

Обследовано 57 пациентов неврологического отделения БМУ «Курская областная клиническая больница» с ХИМ на фоне гипертонической болезни II стадии (основная группа) и 15 практически здоровых людей (контрольная группа). Возраст пациентов составлял от 40 до 60 лет (в среднем — 50 ± 5 лет), представителей контрольной группы — 52 ± 2 года.

Критерии включения в основную группу: мужской пол; наличие ХИМ на фоне гипертонической болезни II стадии, диагностированной 5 и более лет тому назад в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения и Международного общества по артериальной гипертензии (МОГ, 1999). Всем пациентам проводили комплексное клинико-инструментальное обследование по общепринятым стандартам, при этом во всех случаях имела место верификация диагноза ХИМ.

Лабораторные методы исследования эритроцитов периферической крови проводились при поступлении больных в стационар. Эритроциты получали из 5 мл гепаринизированной крови по методу E. Beutler [10], после чего определяли их сорбционную способность (ССЭ) [11] и сорбционную емкость их гликокаликса (СЭГ) [12]. Мембраны эритроцитов выделяли методом G.T. Dodge [13], липиды мембран определяли методом тонкослойной хроматографии [14]. Электрофорез белков проводили в присутствии додецилсульфата натрия в вертикальных пластинах полиакриламидного геля по методу U.K. Laemmli [15], белки окрашивали Кумаси голубым R-250. Выраженность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали путем определения в эритроцитах содержания ацилгидроперекисей (АГП) [16] и малонового диальдегида (МДА) [17]. Кроме этого, определяли общую антиокислительную активность (ОАА) [18],

активность каталазы [19] и супероксиддисмутазы (СОД) [20].

Статистическую обработку результатов исследования проводили, используя непараметрические методы: критерии Вилкоксона—Манна и Уитни, Крускала—Уоллиса. Статистически значимыми считали различия с $p < 0,05$ [21].

Результаты и обсуждение

У пациентов с ХИМ при госпитализации выявлено снижение в эритроцитарной мембране уровня α - и β -спектрина соответственно на 17,2 и 13,2%, анкирина на 29,7%, паллидина на 35,8%, белка полосы 4.5 на 40,7%, дематина на 51,1%, глицеральальдегид-3-фосфатдегидрогеназы (Г-3-ФД) на 44,1% и глутатион-S-трансферазы (Г-S-T) на 68,9% при повышении предстательности белка полосы 4.1 на 18,6%, актина на 19,2%, тропомиозина на 30,4% при нормальном содержании анионтранспортного белка (АТБ) (табл. 1).

Полученные данные свидетельствуют о значительных изменениях со стороны белков, ответственных за структурообразование и стабилизацию мембраны эритроцитов (α - и β -спектрин, дематин — основные белки цитоскелета, анкирин, белок полосы 4.1, паллидин), формообразование и гибкость мембраны (актин, тропомиозин), внутриклеточный метаболизм (Г-3-ФД, Г-S-T, белок полосы 4.5) [3, 22].

При поступлении в клинику у больных ХИМ выявлено также снижение в эритроцитарной мембране содержания фосфатидилхолина (ФХ) на 60,2%, фосфатидилэтаноламина (ФЭ) на 17,4%, фосфати-

дилсерина (ФС) на 41,7%, фосфатидилинозитола (ФИ) на 34,0%, глицерофосфолипидов (ГФЛ — сумма ЛФХ, ФХ, ФЭ, ФС и ФИ) на 31,5%, сфингомиелина (СМ) на 20,5%, фосфолипидов (ФЛ — сумма ГФЛ и СМ) на 30,1%, эфиров холестерина (ЭХ) на 44,2%, суммы холестерина и его эфиров (ХС) на 6,3%, повышение уровня лизофосфатидилхолина (ЛФХ) на 41,3%, свободного холестерина (Х) на 23,2%, триацилглицеролов на 44,6%, свободных жирных кислот на 46,2%, при нормальном содержании моно- и диацилглицеролов (табл. 2).

Следует отметить существенное снижение содержания мембранных ГФЛ и СМ, составляющих основу двойного липидного каркаса клеточной мембраны и играющую основную роль в упорядочивании белковых макромолекул и нормальном метаболизме эритроцитов [3, 4, 23].

При анализе соотношений фракций липидов установлено значительное повышение соотношения ЛФХ/ФХ, СМ/ФХ, СМ/ФС, СМ/ФИ, ХС/ФЛ, Х/ЭХ при снижении ФХ/ФЭ, ФХ/ФС, ФХ/ФИ (табл. 2).

Вероятной причиной повреждения эритроцитов при ХИМ может быть интенсификация свободнорадикальных процессов со снижением активности антиоксидантной защиты эритроцитов, результатом чего является возрастание их чувствительности к перекисным процессам [23, 24]. Для проверки этого предположения проведены соответствующие исследования. Установлена внутриэритроцитарная интенсификация ПОЛ со снижением факторов антиоксидантной защиты, о чем свидетельствует повышение в эритроци-

Таблица 1

Нарушения белкового спектра мембраны эритроцитов при хронической ишемии мозга ($M \pm m$)

Показатели	Здоровые	Пациенты с ХИМ
α -спектрин	114,3 \pm 6,7	94,6 \pm 5,4*
β -спектрин	106,6 \pm 7,6	92,5 \pm 4,2*
Анкирин	192,2 \pm 15,6	135,2 \pm 10,1*
АТБ	188,6 \pm 8,3	189,6 \pm 10,2
4.1	43,3 \pm 3,6	53,2 \pm 2,8*
Паллидин	76,6 \pm 4,8	49,2 \pm 3,3*
4.5	165,7 \pm 11,1	98,2 \pm 8,7*
Дематин	40,1 \pm 2,9	19,6 \pm 1,6*
Актин	102,1 \pm 8,6	126,3 \pm 8,7*
Г-3-ФД	47,8 \pm 2,8	26,7 \pm 2,2*
Тропомиозин	48,8 \pm 7,5	70,1 \pm 3,9*
Г-S-T	149,3 \pm 3,4	46,5 \pm 3,0*

Примечание. В этой и последующих таблицах звездочкой отмечены достоверные отличия средних арифметических ($p < 0,05$); единицы измерения всех показателей в табл. 1 и 2 — мг%.

тах концентрации МДА, АГП, снижение ОАА, активности ферментов СОД и каталазы. Кроме этого, выявлено снижение ССЭ и СЕГ, что возможно объяснить достижением некоторого критического уровня белково-липидного соотношения в эритроцитарной мембране с потерей периферических и частично интегрированных белков, что и приводит к снижению этих показателей (табл. 3).

Неспецифический характер структурно-метаболической дезорганизации эритроцитов, выявленный в последнее время различными научными школами [3, 5, 25, 26] является фактическим доказательством существования типового патологического процесса, реализуемого на уровне мембраны красных клеток крови и не имеющего специфической нозологической, а также этиологической характеристики. Причина та-

Таблица 2

Нарушения липидного спектра мембраны эритроцитов при хронической ишемии мозга ($M \pm m$)

Показатели	Здоровые	Пациенты с ХИМ
Фосфатидилхолин	23,1 ± 2,7	9,2 ± 1,4*
Лизофосфатидилхолин	5,4 ± 0,17	9,2 ± 0,56*
Фосфатидилэтаноламин	23,5 ± 0,97	19,4 ± 1,1*
Фосфатидилсерин	19,9 ± 1,7	11,6 ± 1,32*
Фосфатидинозитол	4,7 ± 0,19	3,1 ± 0,23*
Глицерофосфолипиды	76,6 ± 3,4	52,5 ± 4,1*
Сфингомиелин	11,2 ± 0,52	8,9 ± 0,21*
Фосфолипиды	87,8 ± 4,56	61,4 ± 3,8*
Холестерол	27,8 ± 1,38	36,2 ± 1,4*
Эфиры холестерина	26,2 ± 1,62	14,6 ± 1,2*
Холестерол и холестериды	54,0 ± 1,27	50,8 ± 1,12*
Триацилглицеролы	10,2 ± 0,98	18,4 ± 1,2*
Моно и диацилглицеролы	9,55 ± 0,49	8,9 ± 1,4
Свободные жирные кислоты	2,98 ± 0,17	5,6 ± 0,2*
Соотношение фракций липидов		
ЛФХ/ФХ	0,234 ± 0,02	1,0 ± 0,07*
СМ/ФХ	0,485 ± 0,04	0,967 ± 0,03*
СМ/ФС	0,563 ± 0,04	0,767 ± 0,03*
СМ/ФИ	2,385 ± 0,1	2,871 ± 0,13*
ФХ/ФЭ	0,983 ± 0,1	0,474 ± 0,05*
ФХ/ФС	1,161 ± 0,13	0,793 ± 0,1*
ФХ/ФИ	4,915 ± 0,34	2,968 ± 0,2*
ХС/ФЛ	0,615 ± 0,03	0,827 ± 0,03*
Х/ЭХ	1,061 ± 0,08	2,479 ± 0,06*

Таблица 3

Метаболический статус эритроцитов при хронической ишемии мозга ($M \pm m$)

Показатели	Здоровые	Пациенты с ХИМ
МДА, мкмоль/л	0,33 ± 0,03	1,52 ± 0,02*
АГП, усл. ед.	0,19 ± 0,02	0,94 ± 0,04*
ОАА, %	31,2 ± 2,3	24,8 ± 3,1*
СОД, усл. ед.	16,7 ± 0,49	12,1 ± 1,3*
Каталаза, мккат/л	8,9 ± 0,53	4,31 ± 0,34*
СЕГ, 10 ¹² г/эр.	1,42 ± 0,08	1,06 ± 0,02*
ССЭ, %	32,8 ± 2,8	19,5 ± 2,1*

кого стереотипа структурных изменений мембраны эритроцитов в условиях действия разных патогенных факторов видится в том, что сами молекулярные механизмы повреждения клеток во многом универсальны, даже если причины, вызвавшие это повреждение, различны. Несмотря на то, что комплекс указанных структурно-метаболических нарушений эритроцитов при разных видах стресса и соматической патологии является результатом действия разных первичных патогенных факторов, при всем многообразии заболеваний и патологических процессов имеется сравнительно мало общих типовых механизмов дезорганизации плазматических мембран [3, 5, 26, 27].

К числу таковых, прежде всего, относится дефицит энергопродукции и интенсификация процессов свободнорадикального окисления. Усиление процессов ПОЛ в клеточных мембранах приводит к уплотнению либо деструкции липидного бислоя, увеличению его микровязкости, уменьшению площади белок-липидных контактов, нарушению функциональной активности белков, в том числе ферментов, изменению мембранной проницаемости и поверхностного заряда, нарушению функционального состояния мембрано-рецепторного комплекса. Свободнорадикальное окисление липидных и белковых молекул играет роль триггерного механизма, обеспечивающего доступность липидно-белковых компонентов мембраны эритроцита соответственно для фосфолипаз и протеаз. Нарушение энергетического обмена стимулирует свободнорадикальные процессы в клетке, а активация ПОЛ приводит к повреждению мембраны и усугубляет дефицит энергии. Уменьшение содержания макроэргов в эритроцитах сопровождается накоплением в клетках ионов Ca^{2+} , активацией фосфолипаз, гидролизом части фосфолипидов, увеличением проницаемости мембраны. Наряду с активацией ПОЛ, накопление в эритроцитах ионов Ca^{2+} -вторичного мессенджера, переносящего сигнал от поверхности внутрь клетки, запускает совокупность процессов, к которым, в частности, относятся активация Ca^{2+} -зависимых фосфолипаз и протеаз, приводящих к нарушению структуры мембраны, метаболизма, ионного гомеостаза клетки и в дальнейшем ее формы и функции, в том числе и сорбционных свойств эритроцитов [27, 28, 29].

С учетом данных литературы и ранее полученных результатов [1, 6, 7, 8, 30], по-видимому, пусковым механизмом в развитии нарушений условиях ХИМ структурно-функциональных свойств эритроцитов являются развитие иммунной дисфункции, окислительного стресса, приводящие к иммунному воспалению, окислительному модифицированию фосфолипидного слоя мембран эритроцитов, что нарушает белково-липидный баланс в эритроцитарной мембране и измене-

нию представленности белкового спектра и приводит не только к изменению архитектоники мембраны эритроцитов, но и изменению эпитопной их структуры, что в свою очередь усугубляет иммунные и оксидантные нарушения.

Заключение

Полученные результаты указывают на важную роль эритроцитов в развитии хронической ишемии мозга, что основывается на концепции их участия в цепи приспособительных механизмов, поддерживающих постоянство внутренней среды как в норме, так и в условиях патологии [3, 5, 25, 27—29].

References

1. Gusev E.I., Chukanova A.S. Modern pathogenetic aspects of formation of a chronic ischemia of a brain. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii*. 2015; 3: 4-8. (in Russian)
2. Gusev E.I., Kononov A.N., Skvortsova V.I., Gekht A.B. red. *Neurology*. Natsional'noe rukovodstvo. M: Geotar-med; 2009. 637- 56. (in Russian)
3. Konoplya A.I., Prokopenko L.G., Dolgareva S.A., Loktionov A.L., Konoplya A.A., Gavrilyuk V.P. *Structurally functional properties of erythrocytes in norm and at pathology*. Kursk: KGMU; 2011. (in Russian)
4. Brovkina I.L., Bystrova N.A., Lazarenko V.A., Prokopenko L.G. 4. *Vitamins. Erythrocytes. Immunity*. Kursk: KGMU; 2013. (in Russian)
5. *Erythrocyte dependent effects of medicinal and physiotherapeutic agents* / Lazarev A.I., Brovkina I.L., Gavrilyuk V.P. et al. Kursk: GOU VPO KGMU Roszdrava; 2008. (in Russian)
6. Shumakher G.I., Vorob'eva E.N., Nechunaeva E.V., Khoreva M.A., Vorob'ev R.I., Simonova O.G. i dr. An endothelium dysfunction role in start of immunopathological reactions at a chronic ischemia of a brain. *Byulleten' Sibirskoy meditsiny*. 2008; 5: 214-9. (in Russian)
7. Voronina E.Yu., Laskov V.B., Shul'ginova A.A., Konoplya A.I. *The cytokine range at patients with a chronic ischemia of a brain (discirculatory encephalopathy) and correction of its disturbances*. *Kurskiy nauch.-prakt. vestn. «Chelovek i ego zdorov'e»*. 2014;1: 52-8. (in Russian)
8. Shul'ginova A.A., Voronina E.Yu., Laskov V.B., Konoplya A.I. Pharmacological correction of oxidatatic disturbances at discirculatory encephalopathy. *Allergologiya i immunologiya*. 2014; 15(2):140. (in Russian)
9. Belova L.A., Mashin V.V., Proshin A.N., Kostishko B.B. Impact of a vazonit on a stukturно-functional condition of a cytoplasmatic membrane of erythrocytes of patients with an ischemic stroke. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii*. 2015; 3:83-5. (in Russian)
10. Beutler E. How do red cell enzymes age a new perspective. *Brit. J. Haemat.* 1985; 61: 377-84.
11. Togaybaev A.A., Kurguzkin A.V., Rikun I.V. Way of diagnosis of endogenic intoxication. *Laboratornoe delo*. 1988; 9: 22-4. (in Russian)
12. Semko G.A. Structurally functional changes of membranes and external the primembrannyykh of layers of erythrocytes at a giperepidermopoeza. *Ukrainskiy biokhimicheskiy zhurnal*. 1998, 70; 3:113-8. (in Russian)

13. Dodge G.T., Mitchell C., Hanahan D.J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1963; 100: 119-30.
14. Krylov V.I., Vinogradov A.F., Efremova S.I. Method of a thin-layer chromatography of lipids of membranes of erythrocytes. *Laboratornoe delo.* 1984; 4: 205-6. (in Russian)
15. Laemli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680.
16. Gavrilo V.B., Mishkorudnaya M.I. 16. Spectrophotometric definition of the maintenance of hydroperoxides of lipids in a blood plasma. *Laboratornoe delo.* 1983; 3:33-6. (in Russian)
17. Stal'naya N.D., Garishvili T.G. *A method of definition of a low-new dialdehyde by means of tiobarbiturovy acid. Modern methods in biochemistry / pod red. V.N. Orekhovicha. M.; 1977: 66-8. (in Russian)*
18. Galaktionova L.P., Molchanov A.V., El'chaninova S.A., Varshavskiy B.Ya. A condition of peroksidny oxidati-on of lipids at patients with a peptic ulcer of a stomach and a duodenum. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 1998; 6: 10-4. (in Russian)
19. Korolyuk M.A., Ivanov L.I., Mayorova I.G., Tokarev V.P. Method of determination of activity of a catalase. *Laboratornoe delo.* 1988; 1: 16-9. (in Russian)
20. Kostyuk V.A., Potapovich A.I., Kovaleva Zh.I. The simple and sensitive method of definition of a superoksid-dismutaza based on reaction of oxidation of Quercetinum. *Voprosy meditsinskoy khimii.* 1990; 2:88-91. (in Russian)
21. Lakin G.F. *Biometry.* M.; 1980. (in Russian)
22. Borovskaya M.K., Kuznetsova E.E., Gorokhova V.G. et al. The structurally functional characteristic of a membrane of an erythrocyte and its change at pathologies of a different genesis. *Vyulleten' VSNTs SO RAMN.* 2010; 3(73): 334-54. (in Russian)
23. Shishkina L.N., Shevchenko O.G. Lipids of erythrocytes of a blood and their functional activity. *Uspekhi sovremennoy biologii.* 2010, 130; 6: 587-602. (in Russian)
24. Konoplya A. I., Karaulov A.V., Konoplya A.I., Gavri-lyuk V.P. *Interrelation of correction of immune and oxidatic disturbances with structurally functional properties of erythrocytes at chronic salpingo-oophorites.* Kursk: GOU VPO KGMU Roszdruva; 2009. 180s. (in Russian)
25. Ryazantseva N.V., Novitskiy V.V. Sample disturban-ces of the molecular organization of a membrane of an eryth-rocyte at somatic and mental pathology. *Uspekhi fiziologic-heskikh nauk.* 2004, 1; 1: 53-65. (in Russian)
26. Ivanov V.P., Plotnikov A.V., Solodilova M.A. *Proteins of cellular membranes and vascular dystonias at the person.* Kursk: KGMU; 2004. (in Russian)
27. Prokopenko L.G., Lazarev A.I., Konoplya A.I. red. *Oxidizing, power and immune homeostasis (disturbance and correction).* Kursk: KGMU; 2003. (in Russian)
28. Prokopenko L.G., Brovkina I.L., Bystrova N.A., Ko-noplya A.I., Lazarev A.I., Siplivaya L.E. *Erythrocytes and re-gulation of an immune homeostasis (opening materials).* Kursk: KGMU; 2006. (in Russian)
29. Lazareva G.A., Brovkina I.L., Lazarev A.I., Proko-penko L.G., Konoplya A.I., Denesyuk T.A. *Immunometabo-lic effects of regulators of energy balance at disturbance of a ho-meostasis.* Kursk: KGMU; 2006. (in Russian)
30. Shul'ginova A.A., Voronina E.Yu., Konoplya A.I., Loktionov A.L. System of a complement and immunoglobu-lins at patients with distsirkulyatorny encephalopathy. *Sis-temnyy analiz i upravlenie v biomeditsinskikh sistemakh.* 2014, 13; 2: 466-71. (in Russian)

Поступила 26.06.2015

Сведения об авторах:

Шульгинова Анастасия Александровна, к.м.н., ассистент каф. неврологии и нейрохирургии Курского го-сударственного медицинского университета, e-mail: snaky292@yandex.ru

Порядин Г.В.¹, Власов А.П.², Трофимов В.А.², Власова Т.И.²,
Камкина О.В.¹, Григорьев А.Г.², Власов П.А.²

Кислородтранспортная способность гемоглобина при хирургическом эндотоксикозе

¹ — ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, г.Москва, ул. Островитянова, д. 1

² — ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева» Минобрнауки России, 430005, г.Саранск, ул. Большевикская, д. 68

При хирургическом эндотоксикозе кислородтранспортная способность гемоглобина эритроцитов (средство гемоглобина к лигандам: способность связывать и выделять лиганды) уменьшается и связана с тяжестью эндогенной интоксикации. Нарушение кислородтранспортной функции при эндоинтоксикации сопряжено с перераспределением гемоглобина в эритроците и конформационными перестройками его биомолекулы и может быть вызвано воздействием свободных радикалов и продуктов перекисного окисления липидов, что подтверждено в опытах *in vitro*: под влиянием аскорбата железа кислородсвязывающая способность гемоглобина ухудшается. Во многом аналогичные структурно-функциональные изменения гемоглобина возникают у больных с хирургическим эндотоксикозом.

Ключевые слова: эритроциты; гемоглобин; комбинационное рассеяние; перекисное окисление липидов; эндотоксемия

Для цитирования: Порядин Г.В., Власов А.П., Трофимов В.А., Власова Т.И., Камкина О.В., Григорьев А.Г., Власов П.А. Кислородтранспортная способность гемоглобина при хирургическом эндотоксикозе. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016; 60(1): 23–27

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Poryadin G.V.¹, Vlasov A.P.², Trofimov V.A.², Vlasova T.I.², Kamkina O.V.¹, Grigoryev A.G.², Vlasov P.A.²

Hemoglobin oxygen transport capacity in surgical endotoxycosis

In surgical endointoxication hemoglobin oxygen transport capacity of red blood cells (hemoglobin affinity ligands: the ability to bind and release ligands) is reduced and is associated with the severity of endogenous intoxication. Violation of oxygen transport function of hemoglobin at endogenous intoxication is associated with conformational changes of a biomolecule, and its possible influence on reactive oxygen species, which confirmed in experiments *in vitro*: under the influence of oxygen-iron ascorbate ability of hemoglobin deteriorates. Largely similar structural and functional changes in hemoglobin occur in patients with surgical endotoxycosis.

Keywords: red blood cells; hemoglobin; Raman scattering; lipid peroxidation; endotoxemia

For citation: Poryadin G.V., Vlasov A.P., Trofimov V.A., Vlasova T.I., Kamkina O.V., Grigoryev A.G., Vlasov P.A. Hemoglobin oxygen transport capacity in surgical endotoxycosis. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2016; 60(1): 23–27. (in Russian)

For correspondence: Vlasov A.P., e-mail: vap.61@yandex.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Эндотоксикоз представляет собой опасное осложнение различных острых воспалительных процессов, приводящее к развитию полиорганной недостаточности. В прогрессировании эндотоксикоза, как главного компонента системного воспаления, важная роль отводится нарушениям клеточных функций, обеспечи-

вающих выполнение жизненно важных процессов в организме и возникающих в ходе основного заболевания [1, 2]. Последовательное рассмотрение дисфункции специализированных клеток позволяет сформировать картину патогенеза эндотоксикоза с учетом возникающих патофизиологических наруше-

Для корреспонденции: Власов Алексей Петрович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. факультетской хирургии ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», e-mail: vap.61@yandex.ru

ний, в том числе и гипоксии. Ключевая роль эритроцитов в обеспечении клеточного дыхания определяет актуальность изучения изменений структурно-функционального состояния гемоглобина при эндотоксикозе как механизма противодействующего или способствующего формированию и развитию гипоксии — важнейшего патогенетического фактора различных заболеваний [3].

Цель исследования — изучение кислородтранспортной функции эритроцитов у пациентов с хирургическим эндотоксикозом.

Методика

Исследовали эритроциты венозной крови, стабилизированной глюцициром. Основную группу составили 45 больных острым аппендицитом осложненным перитонитом. В состав группы включено 29 мужчин (64%) и 16 женщин (36%) в возрасте от 25 до 53 лет. При оценке тяжести перитонита использован Мангеймский индекс. У 25 (56%) больных (1-я группа) индекс составил $13,1 \pm 1,22$, что соответствует I степени тяжести, во 2-й — 20 пациентов (44%), — $22,5 \pm 1,34$ — II степень тяжести перитонита. В соответствии с этим выделена легкая и тяжелая степень эндогенной интоксикации. Группу контроля составили 15 здоровых лиц, из них 10 мужчин (67%) и 5 женщин (33%) в возрасте от 29 до 49 лет. В опытах *in vitro* для индукции процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) применяли аскорбат железа (0,01 мМ $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ и 0,2 мМ аскорбиновой кислоты), который добавляли к 1 мл к суспензии эритроцитов (10^6 клеток в 1 мл). Эритроциты предварительно трижды отмывали, а затем концентрировали в среде трис-НСl-буфера (10 мМ, рН 7,4),

содержащего 150 мМ NaCl и 10 мМ глюкозы. Опытные и контрольные пробы (без добавления аскорбата железа) затем инкубировали при 37°C в CO_2 -инкубаторе в течение 60 мин.

Показатели эндогенной интоксикации определяли общепринятыми лабораторно-клиническими и биохимическими методами [4]. Определение маломолекулярного диальдегида проводили в кислой среде при нагревании в реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) спектрофотометрическим методом. Для исследования конформации и свойств гемоглобина интактных эритроцитов в мазках крови применяли метод спектроскопии комбинационного рассеивания [5—7]. Регистрацию спектров комбинационного рассеивания (КР) проводили с помощью рамановского спектрометра *in via Basis* фирмы Renishaw (UK) с лазером, генерирующим возбуждающий свет лазером с длиной 532 нм мощностью 1,5 мВт. Для анализа конформации и O_2 -связывающих свойств Нв использовали соответствующие полосы спектров КР эритроцитов с максимумами при 1355, 1375, 1548—1552, 1580—1588 cm^{-1} соответственно. Относительное количество оксигемоглобина в эритроцитах определяли как отношение интенсивностей $I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$ (I). Относительная способность гемоглобина связывать лиганды рассчитывалась как отношение I_{1355}/I_{1550} (II), относительная способность гемоглобина выделять лиганды — отношение I_{1375}/I_{1580} (III), сродство гемоглобина к лигандам (O_2) — отношение $(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$ (IV), конформационные изменения пирролов — отношение I_{1375}/I_{1172} (V).

Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

Таблица 1

Показатели эндогенной интоксикации у больных острым перитонитом (M ± m)

Показатель	Норма (контроль)	Эндотоксикоз	
		Легкой степени	Тяжелой степени
Молекулы средней массы ($\lambda = 280$ нм) усл. ед. ($\times 10^{-3}$)	$249,2 \pm 19,08$	$478,3 \pm 28,15^*$	$598,3 \pm 37,67^*$
Молекулы средней массы ($\lambda = 254$ нм) усл. ед. ($\times 10^{-3}$)	$296,4 \pm 22,17$	$523,1 \pm 32,14^*$	$689,8 \pm 33,78^*$
Общая концентрация альбумина, г/л	$50,04 \pm 2,17$	$46,5 \pm 3,12^*$	$39,1 \pm 3,34^*$
Эффективная концентрация альбумина, г/л	$45,09 \pm 2,46$	$28,3 \pm 2,82^*$	$18,0 \pm 2,45^*$
Резерв связывания альбумина, усл. ед.	$0,88 \pm 0,04$	$0,61 \pm 0,04^*$	$0,46 \pm 0,06^*$
Индекс токсичности плазмы по альбумину, усл. ед.	$0,13 \pm 0,01$	$0,63 \pm 0,08^*$	$1,17 \pm 0,12^*$
Молочная кислота, ммоль/г белка	$0,25 \pm 0,022$	$0,43 \pm 0,054^*$	$0,63 \pm 0,042^*$
Пировиноградная кислота, ммоль/г белка	$0,035 \pm 0,003$	$0,052 \pm 0,005^*$	$0,059 \pm 0,003^*$
ТБК (тиобарбитуровая кислота) — активные продукты, нмоль/мл	$4,5 \pm 0,5$	$7,2 \pm 0,6^*$	$9,9 \pm 0,5^*$
Индекс гипоксии	$7,11 \pm 0,05$	$8,24 \pm 0,03^*$	$10,65 \pm 0,04^*$

Примечание. — статистически значимые изменения по сравнению с нормой при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Лабораторно-клинические показатели и их величины, согласно которым обследуемых пациентов относили к группам с легкой (1-я группа) или тяжелой (2-я группа) степенью тяжести эндогенной интоксикации приведены в табл. 1.

Выраженность изменений показателей эндотоксикоза зависела от тяжести патологического процесса. Пропорционально тяжести эндотоксикоза у больных возрастала концентрация молекул средней массы, понижались величины общей и эффективной концентраций альбумина, повышался индекс токсичности плазмы. В эритроцитах с увеличением тяжести эндотоксикоза возрастала концентрация ТБК-активных продуктов ПОЛ, превышая при тяжелой форме патологического процесса показатели контроля более чем в 2 раза. Регистрировались явления общей гипоксии, что определялось значимым увеличением концентрации в плазме крови молочной и пировиноградной кислот, ростом индекса гипоксии, который при тяжелой форме эндотоксикоза возрастал более чем на 50% по сравнению с контролем.

Анализ спектров КР показал, что конформационная структура гемопорфирина и, как следствие, кислородсвязывающая способность гемоглобина в эритроцитах больных перитонитом изменяются пропорционально степени тяжести заболевания (рис. 1).

В эритроцитах больных с эндотоксикозом как легкой, так и тяжелой степени не выявлено статистически значимого увеличения содержания оксигемоглобина и уменьшения относительной способности гемоглобина выделять лиганды по сравнению с контрольной группой (табл. 2). Однако при этом в эритроцитах больных с эндотоксикозом тяжелой степени уменьшается относительная способность гемоглобина связывать лиганды на 26,1% ($p < 0,05$), при этом также понижается сродство гемоглобина к лигандам на 17,2% ($p < 0,05$) и возрастают колебания метиновых мостиков на 25,2% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

При легкой форме эндотоксикоза изменения величин параметров, характеризующих кислородтранспортную способность эритроцитов, по сравнению с контролем не достоверны. В эритроцитах больных с хирургическим эндотоксикозом происходят конфор-

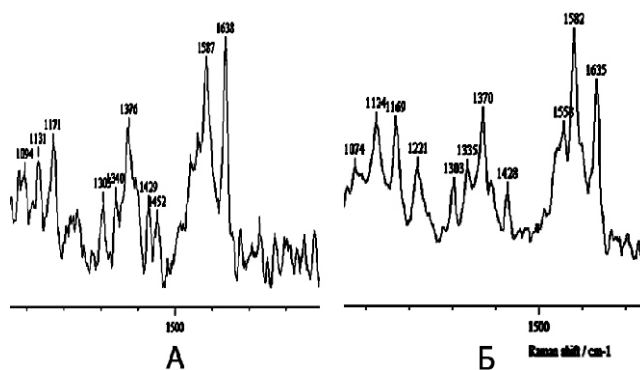


Рис. 1. Спектр комбинационного рассеяния гемоглобина эритроцитов в норме (А) и при эндотоксикозе тяжелой степени (Б). Числами обозначены положения максимумов наиболее выраженных пиков в спектрах комбинационного рассеяния

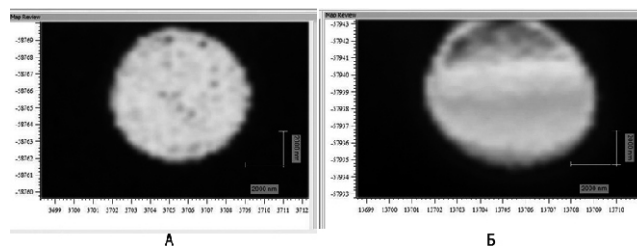


Рис. 2. Распределение гемоглобина в эритроцитах донора (А) и больного с эндотоксикозом тяжелой степени (Б). Изображения распределения гемоглобина по эритроциту получены с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния.

мационные изменения пирролов и в целом гемоглобина, которые предопределяют частичное ингибирование кислородтранспортной способности гемоглобина. Статистически значимые изменения по сравнению с контролем наблюдаются только у больных с эндотоксикозом тяжелой степени.

В крови пациентов с эндотоксикозом часто (71,1%) встречаются эритроциты измененной формы, что свидетельствует о частичном нарушении гемопоеза и о функциональных нарушениях, возникающих на организменном уровне. В эритроцитах у больных с эндотоксикозом зарегистрированы изменения компарментализации гемоглобина (рис. 2).

Таким образом, изменение кислородсвязывающей способности эритроцитов происходит на фоне усиле-

Таблица 2

Показатели спектра комбинационного рассеивания гемоглобина доноров и больных с эндотоксикозом ($M \pm m$)

Показатель	I	II	III	IV	V
Норма (контроль)	0,648 ± 0,003	0,634 ± 0,074	0,699 ± 0,070	0,931 ± 0,051	1,435 ± 0,077
Эндотоксикоз легкой степени	0,670 ± 0,027	0,589 ± 0,061	0,651 ± 0,033	0,912 ± 0,048	1,532 ± 0,060
Эндотоксикоз тяжелой степени	0,704 ± 0,056	0,469 ± 0,126*	0,622 ± 0,043	0,771 ± 0,068	1,798 ± 0,086*

Примечание. — статистически значимые изменения по сравнению с нормой при $p < 0,05$.

ния процессов ПОЛ и накопления вторичных ТБК-реактивных продуктов. В число последних входит малоновый диальдегид, способный образовывать ковалентные сшивки между функциональными группами белков с образованием высокомолекулярных аддуктов. Известно, что в результате образования крупных агрегатов гемоглобина, полученных путем сшивки глутаровым альдегидом нескольких десятков молекул друг с другом, изменяется сродство образующихся комплексов к кислороду [8].

В опытах *in vitro* нами показано, что под влиянием аскорбата железа, способствующего интенсификации процессов ПОЛ в 1,5—1,7 раза, изменяется кислородсвязывающая способность эритроцитов (рис. 3). При воздействии аскорбата железа в спектре КР гемоглобина эритроцитов индуцируются перестройки во многом похожие на изменения спектра КР гемоглобина эритроцитов при эндотоксикозе. В этих условиях по сравнению с нормой отмечаются существенные изменения конформации гемопорфирина, связанные с усилением колебаний метиновых мостиков гемоглобина на 24,3% по отношению к контролю, а также тенденция к уменьшению относительной способности гемоглобина связывать лиганды и понижению сродства к лигандам. При действии аскорбата железа в эритроцитах доноров происходит статистически значимое повышение (на 10,1% по отношению к контролю) относительного количества оксигемоглобина.

Изменение кислородсвязывающей способности гемоглобина эритроцитов под влиянием аскорбата железа может реализовываться посредством усиления процессов ПОЛ, благодаря способности Fe^{2+} взаимодействовать с гидроперекисями фосфолипидов и разлагать их, способствуя разветвлению цепей окисления.

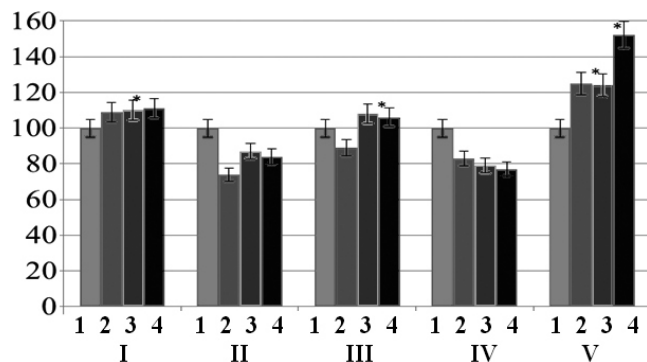


Рис. 3. Изменение показателей (%), характеризующих кислородсвязывающую активность гемоглобина эритроцитов при действии аскорбата железа. По оси ординат: %; по оси абсцисс: 1 — норма, 2 — эндотоксикоз, 3 — норма + аскорбат железа, 4 — эндотоксикоз + аскорбат железа, I—V — параметры. *

Гипоксия рассматривается в качестве важнейшего патогенетического звена развития различных воспалительных заболеваний, что способствует генерализации и хронизации патологического процесса, требующего своевременной коррекции. При гипоксии, вследствие образования в избыточных количествах активных форм кислорода, индуцируются процессы ПОЛ, реализуются мембранодеструктивные явления, провоцирующие развитие клеточных дисфункций. Кроме того, под влиянием активных форм кислорода модулируются гормональные эффекты на местном тканевом уровне [9], изменяется экспрессия многих генов, включая гены транскрипционных факторов — гипоксия-индуцибельного фактора (*HIF*), *NF-κβ*, *c-fos*, *c-jun* и др. [10]. В связи с этим исследование молекулярно-патогенетических основ формирования и развития гипоксии представляет актуальную задачу.

Нами выявлено, что в эритроцитах больных с эндотоксикозом существенно уменьшается относительная способность гемоглобина связывать лиганды и понижается сродство гемоглобина к кислороду, что однозначно свидетельствует о нарушении кислородтранспортной функции эритроцитов при тяжелой форме эндотоксикоза. Причиной этого могут выступать статистически значимые конформационные изменения пирролов и в целом гемоглобина, которые, по-видимому, обусловлены перераспределением гемоглобина внутри клетки. Существенные изменения по сравнению с контролем наблюдали только у больных с тяжелым эндотоксикозом.

Перераспределение гемоглобина, изменение его конформации и кислородсвязывающих свойств при хирургическом эндотоксикозе, вероятно, индуцируются хемомодифицированными молекулами, эндотоксинами накапливающимися в крови и взаимодействующими с клеточной мембраной эритроцита, модифицирующими ее и цитоскелет клетки, тем самым инициируя внутриклеточные перестройки гемоглобина и изменение его кислородтранспортных свойств.

При исследовании с помощью спектроскопии КР кислородтранспортной способности эритроцитов показано [6], что у больных ИБС и с недостаточностью кровообращения снижается содержание оксигемоглобина и увеличивается способность гемоглобина связывать кислород, снижается способность гемоглобина отдавать кислород и сродство гемоглобина к кислороду, увеличивается площадь эритроцитов. Полученные у больных ИБС и сердечной недостаточностью результаты отличаются по направленности от изменений аналогичных величин спектра КР гемоглобина доноров и больных с эндотоксикозом, включая способность связывать лиганды и сродство гемоглобина к лигандам.

Однако ранее у детей с сахарным диабетом 1-го типа в венозной крови отмечено увеличение содержания ком-

плексов гемоглобина с кислородом, причем значимое увеличение содержания оксигемоглобина происходило только при сроке заболевания более 1 года [5]. При этом существенно уменьшалось сродство гемоглобина к кислороду, и понижалась способность гемоглобина связывать кислород, а способность отдавать кислород не менялась. Отметим, что результаты данного исследования, во многом сходны с результатами исследований, полученными нами при исследовании выборки больных с эндотоксикозом тяжелой формы. По-видимому, происходящие при сахарном диабете и хирургическом эндотоксикозе изменения кислородтранспортных свойств гемоглобина эритроцитов, во многом обусловлены схожими причинами и отражают патогенетическую роль эндотоксического компонента заболевания.

Получены доказательства, что продукты перекисидации липидов прямо или косвенно влияют на кислородсвязывающую способность гемоглобина и, как следствие, во многом обуславливают развитие общей гипоксии. Этот факт подтвержден в опытах *in vitro*: под влиянием аскорбата железа кислородсвязывающая способность гемоглобина ухудшается. Установлена зависимость кислородсвязывающей способности гемоглобина от тяжести эндогенной интоксикации и выраженности оксидативного стресса.

Полученный фактический материал позволяет постулировать, что многогранная оценка кислородтранспортной активности эритроцитов и ряда гомеостатических констант, в частности интенсивности липопероксидации, устанавливает конкретные механизмы развития эритроцитарной дисфункции при эндоинтоксикации и на основе этого дает возможность обосновать целесообразные патогенетические схемы коррекции (предупреждения прогрессирования) общей гипоксии при хирургическом эндотоксикозе.

References

1. Bagnenko S.F., Mirzabaev A.T., Batocyrenov B.V. Pharmacological correction of free radical violations and an endotoxicosis at patients with widespread peritonitis in the postoperative period. *Vestnik hirurgii im. I.I. Grekova*. 2011; 170(5): 14-8. (in Russian)
2. Wood B.R., Caspers P., Puppels G.J., Pandiancherri S., McNaughton D. Resonance Raman spectroscopy of red blood cells using near-infrared laser excitation. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007; 387: 1691-703.
3. Власов А.П., Трофимов В.А., Тарасова Т.В., Тюрина Е.П., Котлова Е.В., Ледайкина Л.В. и др. *Структурно-функциональное состояние гемоглобина при гестозе*. 2012; 6. Available at: <http://www.science-education.ru/106-7340>.
4. Karpishhenko A.I., red. *Medical laboratory technologies. [Meditsinskie laboratornye tekhnologii]* Spravochnik. St. Petersburg: Intermedika, 1999. (in Russian)
5. Mitjanina V.A., Parshina E.Ju., Jusipovich A.I., Maksimov G.V., Selishheva A.A. Research of erythrocytes oxygen capacity at children with diabetes of the 1st type on different terms of a disease. *Bul. eksper. biol. med.* (Moscow). 2012; t.153; 4: 499-503. (in Russian)
6. Jusipovich A.I., Brazhe N.A., Luneva O.G., Parshina E.Ju., Churin A.A., Rodnenkov O.V. i dr. Change of hemoglobin status at patients with coronary heart disease and patients with insufficiency of blood circulation. *Bjul. jeksp. biol. med.* (Moscow). 2013; t. 155; 2: 201-203. (in Russian)
7. Brazhe N.A., Abdali S., Brazhe A.R. et al. New Insight into Erythrocyte through In Vivo Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Biophys. J. US*. 2009; v. 97; 12: 3206-14.
8. Kuznecova N.P., Gudkin L.R., Mishaeva R.N. Way of receiving polyhemoglobin with the increased oxygen transport capacity. RU 2132687. МПК G01N33/487. Available at: 10.07.1999. (in Russian)
9. Macrae D., Field D., Mercier J. Inhaled nitric oxide therapy in infants and children: reaching a European consensus. *Intensive Care Med.* 2004; 30: 372-380.
10. Gu Y.Z., Hogenesch J.B., Bradfield C.A. The PAS Superfamily: Sensors of Environmental and Developmental Signals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2000; 40: 519-61.

Поступила 18.12.15

Сведения об авторах:

Порядин Геннадий Васильевич, член-корр. РАН, д.м.н., проф., зав. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»; e-mail: gen@rsmu.ru

Власов Алексей Петрович (Vlasov A.P.) — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой факультетской хирургии ФГБОУ ВПО «Мордовский госуниверситет им. Н.П. Огарева»; e-mail: var.61@yandex.ru.

Трофимов Владимир Александрович (Trofimov V.A.) — д.б.н., профессор, заведующий кафедрой генетики ФГБОУ ВПО «Мордовский госуниверситет им. Н.П. Огарева»; e-mail: geneticLab@yandex.ru

Власова Татьяна Ивановна (Vlasova T.I.) — д.м.н., доцент кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВПО «Мордовский госуниверситет им. Н.П. Огарева»; e-mail: var.61@yandex.ru.

Камкина Ольга Васильевна (Kamkina O.V.) — д.м.н., профессор кафедры физиологии ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»; e-mail: olga.pharma888@rambler.ru

Григорьев Александр Геннадьевич (Grigoryev A.G.) — соискатель кафедры факультетской хирургии ФГБОУ ВПО «Мордовский госуниверситет им. Н.П. Огарева»

Власов Павел Алексеевич (Vlasov P.A.) — к.м.н. доцент кафедры факультетской хирургии ФГБОУ ВПО «Мордовский госуниверситет им. Н.П. Огарева»

Маслов Л.Н.¹, Цибульников С.Ю.^{1,2}, Нарыжная Н.В.¹, Иванов В.В.¹, Цибульникова М.Р.²

Хроническое воздействие холода — адаптация без стресса

¹ — ФГБУ «Научно-исследовательский институт кардиологии», 634012, г.Томск, Россия

² — «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», г.Томск, Россия

Установлено, что длительное непрерывное холодное воздействие (+4°C, 24 ч/сут., 4 нед.) вызывает у крыс увеличение массы бурого жира, гипертрофию надпочечников, селезенки и не влияет на уровни кортизола и кортикостерона в сыворотке крови. Язв желудка у этих крыс не наблюдалось. Хроническое прерывистое воздействие холода (+4°C, 8 ч/сут., 4 нед.) способствует увеличению массы тела, бурого жира, селезенки, почек и сердца, язв желудка не наблюдалось, уровни кортизола и кортикостерона не изменялись. Кратковременное периодическое воздействие холода (+4°C, 1,5 ч/сут., 4 нед.) не влияло на массу бурого жира, но способствовало увеличению массы тела, селезенки, почек и сердца, язв желудка не обнаружено, уровни кортизола и кортикостерона не изменялись.

Ключевые слова: холод; стресс; адаптация

Для цитирования: Маслов Л.Н., Цибульников С.Ю., Нарыжная Н.В., Иванов В.В., Цибульникова М.Р. Хроническое воздействие холода — адаптация без стресса. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016; 60(1): 28—31.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда грант 14-15-00008.

Maslov L.N.^{1,2}, Tsibulnikov S.Yu.^{1,2}, Naryzhnaia N.V.^{1,2}, Tsibulnikova M.R.²

Chronic exposure to cold is adaptation without stress

¹ — Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute for Cardiology, Tomsk, Russia

² — National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia

It has been established that prolonged continuous cold exposure (+4°C for 24 hours/day, four weeks) causes an increase in brown fat weight, hypertrophy of the adrenal gland, spleen and did not affect cortisol and corticosterone levels in the blood serum in rats. Gastric ulcers were not observed in the rats. Chronic intermittent exposure to cold (+4°C, 8 hours/day, 4 weeks) promoted an increase in the weight of brown fat, spleen, kidneys and heart, stomach ulcers and an alteration of cortisol and corticosterone levels were did observed. Short-term intermittent exposure to cold (+4°C, 1.5 hours/day, 4 weeks) did not affect the weight of brown fat, but promoted an increases in the weight of body, spleen, kidneys and heart, stomach ulcers were not found, cortisol and corticosterone levels was not changed.

Keywords: cold; stress; adaptation

For citation: Maslov L.N.^{1,2}, Tsibulnikov S.Yu.^{1,2}, Naryzhnaia N.V.^{1,2}, Tsibulnikova M.R.² Chronic exposure to cold is adaptation without stress. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2016; 60(1): 28—31. (in Russian)

For correspondence: Maslov N. Leonid, Doctor of Medical Sciences, professor, head of the Laboratory of Experimental Cardiology, Institute of Cardiology, 634012 Tomsk, e-mail: maslov@cardio-tomsk.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study was supported by Grant of the Russian Science Foundation

По мнению Г. Селье, стресс является общей неспецифической адаптационной реакцией организма на чрезвычайные по силе раздражители [1]. Вместе с тем, в своих поздних работах он различал эустресс (нормальная адаптивная реакция на экстремальный фактор) и дистресс (патологическая адаптивная реакция на чрезмерный по силе раздражитель) [2, 3]. По мнению Г. Селье [2, 3], дистресс приводит к повреждению органов и тканей и может участвовать в патогенезе некоторых заболеваний, прежде всего заболе-

ваний сердечно-сосудистой системы и язвенной болезни желудка. В эксперименте дистресс можно легко зафиксировать по появлению язв в желудке у подопытных животных

В литературе отсутствуют данные о том, что адаптация к холоду вызывает формирование язв желудка. Однако имеются сведения о том, что хроническое воздействие холода может вызывать типичные для стресса гипертрофию надпочечников [4] и инволюцию тимуса [5]. Вместе с тем, есть данные о том, что хроническое воз-

Для корреспонденции: Маслов Леонид Николаевич, доктор мед. наук, проф., зав. лаб. экспериментальной кардиологии, НИИ кардиологии, e-mail: maslov@cardio-tomsk.ru

действие холода не влияет на величину надпочечников [6]. Вполне вероятно, что в зависимости от характера воздействия, вызывающего адаптивную реакцию на хроническую холодную экспозицию может формироваться хронический эустресс или могут наблюдаться только адаптивные изменения без триады Селье.

Цель исследования — изучение хронического холодного воздействия на показатели стресс-реакции у крыс.

Методика

Моделирование адаптации к холоду. Исследование выполнено на крысах-самцах Вистар массой 200—220 г. Крыс помещали в холодильную камеру при +4°C по 2 в клетке. Использовали три протокола исследований. В 1-м — животные постоянно находились в холодильной камере при +4°C в течение 4 нед. [7]. При использовании 2-го протокола животных подвергали воздействию температуры +4°C по 8 ч ежедневно в течение 4 нед. [8]. Согласно третьему протоколу, крысы находились в холодильной камере при +4°C по 1,5 ч ежедневно в течение 28 сут. [9]. Интенсивность стресс-реакции оценивали количественно по изменению массы тимуса, надпочечников и селезенки, а также по числу язв на слизистой желудка и уровню кортизола в сыворотке кро-

ви животных, для чего использовали шкалу В.И. Добрякова (табл. 1) в нашей модификации [10]. Для оценки адаптации к холоду определяли массу межлопаточного бурого жира [11].

Непосредственно после декапитации под эфирным наркозом забирали кровь, которую центрифугировали в течение 15 мин со скоростью 3000 об/мин. Полученную сыворотку крови замораживали в морозильной камере (при -18С) и хранили до 2 нед. Измерение уровня кортизола проводили радиоиммунным методом с помощью набора «Cortisol RIA KIT» IM1841 (Beckman Coulter, Immunotech, Прага, Чехия). Радиоактивность проб определяли с помощью многоканального радиометра РИГ-12 «Прогресс-РИА» (Россия, Санкт-Петербург). Определение уровня кортикостерона проводили с помощью иммуоферментного набора «Corticosterone (Human, Rat, Mouse) ELISA» RE52211 (IBL International GmbH, Hamburg, Germany) с использованием микропланшетного считывателя Infinite 200 PRO (Tecan Austria GmbH, Salzburg, Austria).

Статистическую обработку данных проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна—Уитни. Результаты выражали как среднее арифметическое (M) ± стандартная ошибка средней (SEM, standard error of means). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Таблица 1

Оценки степени стресс-реакции животных

Исследуемый орган	Баллы					
	0	1	2	3	4	5
Надпочечник	100%	101—111%	112—123%	124—135%	136—150%	>150%
Тимус	100%	99—86%	85—74%	73—62%	61—50%	<50%
Селезенка	100%	99—86%	85—74%	73—62%	61—50%	<50%
Желудок (число язв), шт.	0	0—0,9	1—1,9	2—2,9	3—4,0	4

Примечание. Расчет производится относительно контрольных значения, принятых за 100%.

Таблица 2

Морфологические показатели стресс-реакции у крыс (M ± SEM)

Группа	Масса крысы, г	Масса бурого жира, мг	Масса тимуса, мг	Масса надпочечников, мг	Масса селезенки, мг	Масса почек, мг	Масса сердца, мг	Балл стресса
Интактные крысы, n = 12	282,6 ± 9,3	300,4 ± 38,2	240,5 ± 13,1	35,6 ± 2	1059,5 ± 96,1	2068 ± 117,3	825,4 ± 55,5	0
Холод 24 часа, 4 недели, n = 15	264,8 ± 3,56	764,6 ± 30,5; P<0,01	217,4 ± 12,9	49,7 ± 2,0; P<0,05	933,9 ± 45,2	1531,1 ± 27,4*	853,4 ± 15,8	7,1 ± 0,3
Холод 8 часов, 4 недели, n = 12	338,83 ± 5,74*	566,7 ± 28,9; P<0,01	339,5 ± 13,73*	29 ± 1,1	1315,83 ± 58,61*	2696,66 ± 38,77*	1174,16 ± 17,72*	0
Холод 1,5 часа, 4 недели, n = 12	364,7 ± 12,5*	311,7 ± 21,1	343,5 ± 15,2*	30,5 ± 1,2	1460 ± 94,3*	2634,2 ± 74,08*	1212,5 ± 31,6*	0

Примечание. M — среднее значение масс органов; m — ошибка среднего; n — число крыс в группе; p — достоверность относительно интактных животных.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты представлены в табл. 2. Установлено, что непрерывное воздействие холода ($+4^{\circ}\text{C}$, 4 нед.) вызывает двукратное увеличение массы бурого жира в сравнении с интактными животными. При непрерывном воздействии холода (4 нед.) масса надпочечников увеличилась на 40% по сравнению с интактными животными. Уровень кортизола и кортикостерона в сыворотке крови при этом не изменялись (см. рисунок). На слизистой желудка язвы у адаптированных особей отсутствовали. Масса почек после длительной холодной экспозиции уменьшалась. Изменений массы тела и ряда внутренних органов выявить не удалось. Средний балл стресса по шкале Добрякова у данной группы животных составлял 7,1.

После применения протокола 2 ($+4^{\circ}\text{C}$, 8 ч/сут., 4 нед.) холодное воздействие приводило к увеличению массы тела на 25%. Масса бурого жира возрастала в полтора раза по сравнению с интактными животными, тимуса, селезенки, почек и сердца увеличивалась в среднем на 30%, масса надпочечников не изменялась, язвы в желудке отсутствовали. Уровни кортизола и кортикостерона в сыворотке крови не изменялись относительно показателей интактных крыс (см. рисунок). Средний балл стресса по шкале Добрякова у данной группы животных составлял 0.

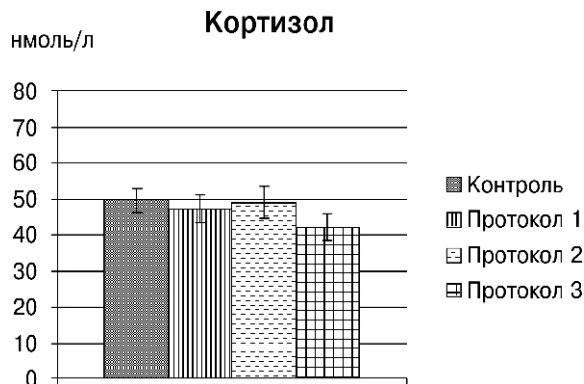


Рис. 1. Уровень кортизола в крови испытуемых животных.

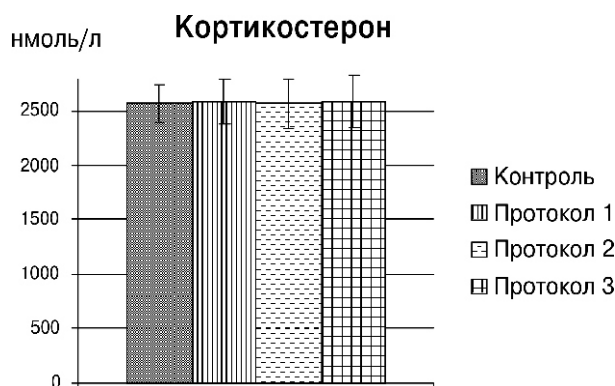


Рис. 2. Уровень кортикостерона в крови испытуемых животных.

У животных, адаптированных согласно протоколу 3 ($+4^{\circ}\text{C}$, 1,5 ч/сут., 4 нед.), холодное воздействие обеспечивало увеличение массы тела на 25%, по сравнению с интактными животными, масса тимуса селезенки, почек и сердца увеличивалась в среднем на 30%, масса бурого жира и масса надпочечников не изменялась (табл. 2). Не изменялись относительно показателей интактных животных и уровни кортизола и кортикостерона в сыворотке крови. Язвенных дефектов в желудке крыс после холодного воздействия не наблюдалось. Средний балл стресса был равен 0.

Как известно, бурый жир играет важную роль в термогенезе и акклиматизации к холоду. Увеличение массы бурой жировой ткани считается показателем адаптации к холодному воздействию [11].

Полученные данные указывают на то, что длительное холодное воздействие ($+4^{\circ}\text{C}$, 4 нед.) вызывает адаптационную реакцию организма на холод, о чём свидетельствует увеличение массы надпочечников и бурого жира, что, по мнению многих исследователей [4, 12, 13], является признаком адаптивной реакции на длительное воздействие низкой температуры. Обычно после длительной холодной экспозиции отмечается увеличение массы почек [4, 12—15], поэтому снижение массы этого органа было несколько неожиданным.

Увеличение массы бурого жира, обнаруженное после адаптации по второму протоколу ($+4^{\circ}\text{C}$, 8 ч/сут., 4 нед.), свидетельствует об адаптации к холоду. Наши результаты говорят о том, что акклимация к холоду произошла, но при этом не отмечалось развития стресс-реакции. Действительно, мы не обнаружили у крыс ни язв желудка, ни инволюции тимуса и селезенки, ни гипертрофии надпочечников. Уровень кортизола и кортикостерона у адаптированных особей тоже не увеличивался. После экстремального воздействия отмечается усиление катаболизма и, как следствие, может снижаться масса тела [1]. Мы же, напротив, обнаружили увеличение массы тела, селезенки, тимуса, почек и сердца после холодной экспозиции, что прямо противоположно реакции организма на стрессор [1]. Подобное повышение массы тела и органов, по-видимому, является следствием активации анаболических реакций. Обычно исследователи отмечают отсутствие изменений массы тела подопытных животных после длительной холодной экспозиции [15] или даже снижение массы тела после адаптации к холоду [12, 14]. В наших экспериментах было зафиксировано увеличение массы тела. Причина расхождений результатов состоит в том, что упомянутые авторы использовали непрерывную холодную экспозицию, мы же — прерывистое холодное воздействие. Повышение массы сердца и почек является типичным признаком холодной акклимации [4, 12, 13, 14]. При использовании протокола 2 мы не обнаружили изменения массы надпочечников, что согласуется с данными канадских физиологов, которые не обнаружили у крыс изменения массы указанных

органов после периодической холодной экспозиции (+4°C, 4 ч/сут., 3 нед.) [6].

Известно, что длительное воздействие холода вызывает уменьшение массы тимуса и селезенки у мышей [5] и способствует уменьшению массы тимуса у крыс [6, 16]. Мы же, напротив, отмечали увеличение массы указанных органов. Причина подобного расхождения данных литературы и результатов наших исследований остаётся неясной. Возможно, причина в том, что в большинстве работ, в которых было обнаружено снижение массы селезенки и тимуса, использовали непрерывную холодную экспозицию [5, 16], а мы — прерывистое холодное воздействие. Согласно Г. Селье [1], стресс характеризуется инволюцией тимуса и селезенки с последующей супрессией иммунных реакций. Мы не исследовали иммунитет у адаптированных крыс, но можем предположить, что иммунный ответ у них не подавлялся, поскольку масса указанных органов не изменялась в случае непрерывного воздействия холода или даже увеличивалась при прерывистой холодной экспозиции. Эти факты говорят о том, что использованные нами холодные воздействия не являются стрессом и могут рассматриваться, как холодная акклимация. Следовательно, периодическое холодное воздействие (+4°C, 8 ч/сут., 4 нед.) является адаптивной реакцией на холод.

Увеличение массы бурого жира является одним из основных критериев адаптации к холоду [11]. Однако при использовании третьего протокола (+4°C, 1,5 ч/сут., 4 нед.) масса бурого жира не менялась, что говорит об отсутствии акклимации к холоду. У этих особей мы не обнаружили язв желудка. Уровни кортизола и кортикостерона были такими же, как у интактных животных. Однако после длительной холодной экспозиции у крыс отмечалось увеличение массы тела, тимуса, селезенки, почек, сердца, что, видимо, является результатом усиления анаболизма. Следовательно, периодическое кратковременное воздействие холода (+4°C, 1,5 ч/сут., 4 нед.) не является ни стрессом, ни адаптацией к холоду.

Таким образом, хроническое непрерывное воздействие холода (+4°C, 4 нед.) и хроническое периодическое воздействие холода (+4°C, 8 ч/сут., 4 нед.) вызывает адаптивный ответ, но не является хроническим стрессом. Хроническое периодическое кратковременное воз-

действие холода (+4°C, 1,5 ч/сут., 4 нед.) не вызывает ни стресс-реакции, ни адаптации к холоду.

References

1. Selye H. *Ocherki ob adaptatsionnom syndrome (The story of the adaptation syndrome)* Per. S angl., M. Medgiz; 1960.
2. Selye H. Stress bez distressa. (Stress without distress). M.: Progress. 1978.
3. Selye H. Forty years of stress research: principal remaining problems and isconceptions. *Can. Med. Assoc. J.* 1976; 115(1): 53-6.
4. Sun Z., Cade J.R., Fregly M.J., Rowland N.E. Effect of chronic treatment with propranolol on the cardiovascular responses to chronic cold exposure. *Physiol. Behav.* 1997; 62(2): 379-84.
5. Cichon M., Chadzinska M., Ksiazek A., Konarzewski M. Delayed effects of cold stress on immune response in laboratory mice. *Proc. Biol. Sci.* 2002; 269(1499):493-1497.
6. Bhatnagar S., Meaney M.J. Hypothalamic-pituitary-adrenal function in chronic intermittently cold-stressed neonatally handled and non handled rats. *J. Neuroendocrinol.* 1995; 7(2): 97-108.
7. Kvetnansky R., Ukropec J., Laukova M., Manz B. Stress stimulates production of ^cholamines in rat adipocytes. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2012; 32(5): 801-13.
8. van Bergen P., Fregly M.J., Rossi F., Shechtman O. The effect of intermittent sure to cold on the development of hypertension in the rat. *Am. J. Hypertens.* 1992; 5(8): 548-55.
9. Bozhko A.P., Gorodetskaya I.V. The value of thyroid hormones in the cold adaptation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimentalnaya Terapiya.* 1994; 4: 29-32.
10. Dobryakov V.I. *Stess and adaptation.* Tez. Vsesoyuzn. simpoziuma. Kishinev, SHTince; 172.
11. Cannon B., Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological — significance. *Physiol. Rev.* 2004; 84(1): 277-359.
12. Fregly M.J., Rossi F., Cade J.R. A role for thyroid hormones in cold-induced elevation of blood pressure and cardiac hypertrophy. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1994a; 72(9): 1066-74.
13. Riesselmann A., Baron A., Fregly M.J., van Bergen P. Hypertension during chronic exposure to cold: comparison between Sprague-Dawley and Long-Evans strains. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1992; 70(5): 701-8.
14. Fregly M. J., Shechtman O., van Bergen P., Reeber C. Changes in blood pressure and Epsogenic responsiveness to angiotensin II during chronic exposure of rats to cold. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1991; 38(4): 837-42.
15. Fregly M.J., Rossi F., Sun Z., Turner N. Effect of chronic treatment with prazosin L-arginine on the elevation of blood pressure during cold exposure. *Pharmacology.* 1994b; 49(6): 351-62.
16. Manciulea S., Giurgea R., Ilyes I. Changes of functional state of liver, thymus and fenals, in cold acclimatized white rats. *Zentralbl. Veterinarmed A.* 1976; 23(6): 454-9.

Поступила 02.02.14

Сведения об авторах:

Цибульников Сергей Юрьевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. экспериментальной кардиологии, «НИИ кардиологии», e-mail: tsibulnikov@outlook.com

Нарыжная Наталья Владимировна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. экспериментальной кардиологии «НИИ кардиологии», e-mail: natalynar@yandex.ru

Иванов Владимир Владимирович, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. экспериментальной кардиологии «НИИ кардиологии», e-mail: Ivanovvv.1953@qip.ru

Цибульникова Маргарита Радиевна, к.г.н., доцент, доцент кафедры экономики природных ресурсов ФГАОУ ВПО Национальный исследовательский Томский политехнический университет, тел 3822 557054; e-mail: tsibulnikova@yandex.ru

Радзинский В.Е.¹, Оразов М.Р.¹, Носенко Е.Н.²

Экспрессия сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF) в тканях матки как один из механизмов аллогенеза при аденомиозе, ассоциированном с хронической тазовой болью

¹ — ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

² — «Одесский национальный медицинский университет» МОЗ Украины, 65082, Украина, Одесса, пер. Валиховский, д. 2

Цель исследования: изучение особенностей экспрессии VEGF в тканях матки у пациенток с аденомиозом, ассоциированным с хронической тазовой болью.

Методика. Для морфологического исследования использовали фрагменты стенок 60 маток, полученных после гистерэктомии у пациенток с тазовой болью на фоне диффузного аденомиоза II—III степени, и 30 маток с безболевым формой аденомиоза. В тканях эндометрия и миометрия иммуногистохимическим методом определяли экспрессию фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF).

Результаты. Показано статистически значимое повышение экспрессии VEGF у пациенток с болевым фенотипом аденомиоза по сравнению с аналогичными показателями у женщин с безболевым формой аденомиоза, соответственно, в эпителиальных клетках эктопического эндометрия ($14,7 \pm 1,6$ против $10,7 \pm 1,6\%$, $p < 0,01$), в гладких миоцитах миометрия ($12,6 \pm 1,4$ против $9,6 \pm 1,2\%$, $p < 0,01$), в клетках стромы миометрия ($10,1 \pm 1,9$ против $7,4 \pm 1,8\%$, $p < 0,01$).

Выводы: повышение экспрессии VEGF в тканях матки при аденомиозе, ассоциированном с синдромом хронической тазовой боли, по сравнению с безболевым фенотипом заболевания является одним из важнейших патогенетических механизмов аллогенеза при аденомиозе и формировании болевого фенотипа заболевания.

Ключевые слова: аденомиоз; тазовая боль; аллогенез; матка; неоваскуляризация; сосудисто-эндотелиальный фактор роста

Для цитирования: Радзинский В.Е., Оразов М.Р., Носенко Е.Н. Повышенная экспрессия сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF) в тканях матки как один из механизмов аллогенеза при аденомиозе, ассоциированном с хронической тазовой болью. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016; 60(1): 32—35.

Благодарность. Авторы выражают огромную благодарность в проведении морфологических и иммуногистохимических исследований д. мед. н., профессору кафедры гистологии и эмбриологии Донецкого медицинского университета, профессору Сулаевой Оксане Николаевне и зав. патологоанатомического отделения ФГБУНИИ урологии МЗ РФ Ефремову Геннадию Дмитриевичу.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов.

Radzinskiy V.E.¹, Orazov M.R.¹, Nosenko O.M.²

Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in uterine tissues as one of the mechanisms of algogenesis in adenomyosis, associated with chronic pelvic pain

¹ — Russian University of Peoples' Friendship, 117198, Moscow, str. Miklukho-Maklaya, 6

² — Odessa National Medical University, Ukraine, 65082, Ukraine, Odessa, lane Valihovsky, 2

Objective: to study the expression of VEGF in the uterus tissue in patients with adenomyosis associated with chronic pelvic pain.

Methods. For morphological studies it were using fragments of walls 60 uterus, received after hysterectomy in patients with pelvic pain on a background of diffuse adenomyosis II—III degree, and 30 uterus of women with painless form of adenomyosis. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) was measured in endometrial and myometrial tissues using immunohistochemistry.

The results showed a significantly higher expression of VEGF in patients with adenomyosis pain phenotype compared to the same in women with silent form in the epithelial cells of ectopic endometrium ($14,7 \pm 1,6$ vs. $10,7 \pm 1,6\%$, $p < 0,01$) in the smooth muscle cells of the myometrium ($12,6 \pm 1,4$ vs. $9,6 \pm 1,2\%$, $p < 0,01$), in the stromal cells of the myometrium ($10,1 \pm 1,9$ vs. $7,4 \pm 1,8\%$, $p < 0,01$).

Для корреспонденции: Радзинский Виктор Евсеевич, доктор мед. наук, проф., заслуженный деятель науки РФ, зав. каф. акушерства и гинекологии с курсом перинатологии РУДН, отрасль специализации - акушерство и гинекология, e-mail: omekan@mail.ru

Keywords: adenomyosis; pelvic pain; algogenezis; uterus; neovascularization; vascular endothelial growth factor

For citation: Radzinsky V.E., Orazov M.R., Nosenko O.M. Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in uterine tissues as one of the mechanisms of algogenezis in adenomyosis, associated with chronic pelvic pain. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2016; 60(1): 32–35. (in Russian)

Conclusions: The increased expression of VEGF in the uterus with adenomyosis tissues, associated with chronic pelvic pain, compared to the pain-free phenotype of the disease is one of the most important pathogenetic mechanism of algogenezis in adenomyosis and the formation of a painful disease phenotype.

Conflict of interest: The authors declare that there is no potential conflict of interest.

For correspondence: Radzinsky V.E., e-mail: omekan@mail.ru

Аденомиоз является частой причиной тазовой боли, аномальных маточных кровотечений и преждевременного прерывания беременности у женщин репродуктивного возраста [1–3]. При аденомиозе значительно возрастает активность процесса неоваскуляризации и нейрогенеза в эндометрии и миометрии [4]. Уже в начале развития патологического процесса регистрируется повышенная плотность кровеносных сосудов, расширение их просвета и увеличение количества «незрелых сосудов». Еще более выражены эти процессы в регионах эндометриодных гетеротопий при прогрессировании аденомиоза [6, 7]. Эндометриоз, в частности аденомиоз относят к группе ангиогенных заболеваний, включающих солидные опухоли, ревматоидный артрит, псориаз и диабетическую ретинопатию [8].

Основным пусковым фактором ангиогенеза и васкулогенеза в физиологических условиях и патологии является васкулоэндотелиальный фактор роста (VEGF). Кроме того, VEGF как сильный фактор сосудистой проницаемости и мобилизации лейкоцитов участвует в развитии воспалительного процесса [9–13].

В последнее время появились работы, в которых указывается на особую роль неоваскуляризации в патогенезе аденомиоза, сопровождающегося тазовой болью. Подтвержденная тесная связь нервных волокон с кровеносными сосудами, предполагает, что неоваскуляризация играет важную роль в развитии хронической тазовой боли [7, 14].

Цель исследования — изучение особенностей экспрессии VEGF в тканях матки у пациенток с аденомиозом, ассоциированным с хронической тазовой болью.

Методика

Исследовали фрагменты стенок 60 маток, полученных после гистерэктомии у пациенток с диффузным аденомиозом II—III степени, сопровождающимся выраженным болевым синдромом. Пациентки были прооперированы в пролиферативную фазу цикла. Контрольную группу составили матки 30 пациенток с безболевым аденомиозом.

После гистерэктомии участки стенки матки, включающие эндометрий и миометрий, обрабатывали согласно общепринятым в гистологии процедурам приготовления парафиновых срезов. Срезы окрашивались гематокси-

лином и эозином. Иммуногистохимические (ИГХ) исследования осуществляли авидин-биотин-пероксидазным методом по стандартной методике. Для визуализации исследуемого объекта использовали моноклональные антитела (МАТ) к человеческому VEGF (Clone VG1, code No. M7273, «DakoCytomation», Дания), оценивали удельное количество положительно реагирующих клеток. Положительным контролем с известной иммунореактивностью соответствующих эпитопов при окраске тканей для VEGF была использована ткань ангиосаркомы. Пропуск первичного антитела служил в качестве негативного контроля. Неспецифического окрашивания обнаружено не было.

При оценке экспрессии VEGF подсчитывали положительно окрашенные клетки и рассчитывали процент положительно реагирующих клеток по отношению ко всем клеткам стромы или желез в изученных полях зрения. Расчет осуществлялся не менее, чем на 1000 клеточных элементов стромы или желез. Оценку количества клеток проводили в 10 разных полях зрения каждого препарата при увеличении $\times 200$, соответствующем $0.785 \text{ mm}^2/\text{поле зрения}$, с участием двух независимых специалистов.

С целью объективизации морфологического исследования использовали комплексный автоматизированный морфометрический анализ, который проводили с помощью специального программного обеспечения ImageTool version 3.0. и графического редактора Adobe Photoshop CS4 Extended v.11.0.1. Снимки выполнены на микроскопе Olympus BX51 с цифровой камерой DP70 (Olympus, Япония).

Статистическую обработку материала выполняли при помощи программы «Statistica for Windows, 7.0».

Результаты и обсуждение

Ранее при гистологическом исследовании операционного материала пациенток, как с болевой, так и с безболевой формами аденомиоза, обнаружено повышенное количество сосудов и нервных структур в миометрии [7].

Интерес представлял анализ источников продукции ключевого стимулятора ангио- и нейрогенеза — VEGF. Как показали результаты ИГХ исследования, основным источником VEGF при аденомиозе являются эпителиальные структуры аутопического и

эктопического эндометрия, хотя статистически значимая реакция на данный фактор роста определялась и в структурах миометрия.

Наиболее значимым продуцентом VEGF в эутопическом эндометрии был покровный и железистый эпителий. В строме эутопического эндометрия экспрессия данного фактора роста была ниже — лишь в 2% клеток определялась позитивная реакция на VEGF. Более обширной, в сравнении с эндометрием, оказалась экспрессия VEGF в миометрии пациенток с аденомиозом. Здесь большинство клеток обнаруживало слабую или умеренную реакцию на VEGF. Интересно, что в миометрии экспрессия VEGF была обнаружена как в цитоплазме гладких миоцитов, так и в структурах стенки сосудов, где продуцентами данного фактора роста чаще всего являлись гладкие миоциты и клетки адвентиции. Характерно, что в периваскулярном компартменте, количество клеток, имеющих интенсивную иммунопозитивную реакцию, при болевой форме аденомиоза было более выраженным ($16,1 \pm 1,2$ против $10,9 \pm 1,9\%$ соответственно). Выраженная положительная реакция на VEGF определялась также в отдельных клетках стромы между пучками гладких миоцитов. Умеренная экспрессия VEGF определялась также в эндотелии сосудов миометрия в участках его ремоделирования. Высокой оказалась цитоплазматическая экспрессия VEGF и в железистом эпителии очагов аденомиоза. Теоретически это может быть связано с наличием вокруг участков инвазии ectopического эндометрия миофибробластов, являющихся продуцентом широкого спектра факторов роста, включая VEGF. Однако, как оказалось, наиболее выраженная экспрессия данного стимулятора ангиогенеза в строме миометрия была ассоциирована преимущественно с участками ремоделирования миометрия, периваскулярными регионами и с зонами инфильтрации.

Характерно, что экспрессия VEGF у пациенток с болевой формой аденомиоза статистически значимо превышала аналогичные показатели при безболевой форме: в эпителиальных клетках ectopического эндометрия ($14,7 \pm 1,6$ против $10,7 \pm 1,6\%$), в гладких миоцитах миометрия ($12,6 \pm 1,4$ против $9,6 \pm 1,2\%$), в клетках стромы миометрия ($10,1 \pm 1,9$ против $7,4 \pm 1,8\%$). В группе контроля, в некоторых случаях (3,5%) экспрессия VEGF была ассоциирована только с железистым эпителием эндометриальных гетеротопий, а в клетках стромы миометрия экспрессия VEGF полностью отсутствовала. Данные о распространенном характере экспрессии VEGF при аденомиозе, подтверждают и другие исследователи [29]. Однако полученные этими авторами данные не рассматривались с позиций аденомиоза с болевой формой.

VEGF также является митогеном для астроглии и шванновских клеток *in vitro* [16—18]. Исследования показали, что экзогенный VEGF-A модулирует симпатическую иннервацию сосудов, увеличивает число отростков симпатических ганглиев [19] и способствует росту симпатических аксонов у хирургически денервированных взрослых крыс [20]. Рост аксонов регулируется VEGF независимо от его сосудистой роли, через два рецептора: либо VEGFR2 [21] или нейрофилин-1 (NRP1) [22]. NRP1 и NRP2, первоначально обнаруженные в качестве нейрональных рецепторов для семафоринов, образуют комплекс с VEGFR-2 и VEGFR-1 [23]. Последние данные свидетельствуют о том, что NRP1 в эндотелиальных клетках также может передавать сигналы VEGF независимо от VEGFR-2 [24, 25], а также, что потеря NRP1 или NRP2 связаны с отчетливыми сосудистыми и нейронными дефектами [26]. Тем не менее, до сих пор неясно, происходят ли эти процессы непосредственно с помощью ангиогенеза, индуцированного фактором роста нервов (NGF), или косвенно посредством индукции классических ангиогенных факторов, таких, как VEGF [27].

Интересно отметить, что эти два плеiotропных фактора (VEGF и NGF), а также другие нейротрофины (NT-3, NT-4/5 и BDNF) экспрессируются ectopическими эндометриальными клетками. В последнее время исследования *in vitro* и *in vivo* предоставили первые подсказки о механизмах боли при эндометриозе. У взрослых самок крыс с хирургической индукцией эндометриоза, динамические эстральные изменения как VEGF, так и NGF в эндометриальных кистах происходят параллельно с изменениями в иннервации и васкуляризации. Предполагается, что иннервация в модели эндометриоза происходит путем взаимодействия периваскулярных нервных волокон, сопровождающих рост кровеносных сосудов при неоваскуляризации [7, 28].

Таким образом, на основании полученных данных о повышении экспрессии VEGF в эутопическом и ectopическом эндометрии в зонах ремоделирования миометрия на фоне увеличения количества нервных структур при аденомиозе, ассоциированном с синдромом хронической тазовой боли, можно сделать заключение, что одним из важнейших патогенетических механизмов аллогенеза при аденомиозе и формировании болевой формы заболевания является повышенная экспрессия VEGF и интенсификация неоваскуляризации.

Таким образом, на основании полученных данных о повышении экспрессии VEGF в эутопическом и ectopическом эндометрии в зонах ремоделирования миометрия на фоне увеличения количества нервных структур при аденомиозе, ассоциированном с синдромом хронической тазовой боли, можно сделать заключение, что одним из важнейших патогенетических механизмов аллогенеза при аденомиозе и формировании болевой формы заболевания является повышенная экспрессия VEGF и интенсификация неоваскуляризации.

References

- Huang T.S., Chen Y.J., Chou T.Y., Chen C.Y., Li H.Y., Huang B.S. et. Oestrogen-induced angiogenesis promotes adenomyosis by activating the Slug-VEGF axis in endometrial epithelial cells. *J. Cell. Mol. Med.* 2014; 18(7): 1358-71. doi: 10.1111/jcmm.12300.
- Brosens I., Pijnenborg R., Benagiano G. Defective myometrial spiral artery remodelling as a cause of major obstetrical syndromes in endometriosis and adenomyosis. *Placenta.* 2013; 34(2):100-5. doi: 10.1016/j.placenta.2012.11.017.

3. Benagiano G., Brosens I., Habiba M. Structural and molecular features of the endomyometrium in endometriosis and adenomyosis. *Hum. Reprod. Update.* 2014; 20: 386-402.
4. Mu Y., Hu X., He J., Liu H., Zhang L., Liu H. et al. Serum levels of vascular endothelial growth factor and cancer antigen 125 are related to the prognosis of adenomyosis patients after interventional therapy. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8(6): 9549-54.
5. Giudice L.C. Clinical practice. Endometriosis. *N. Engl. J. Med.* 2010; 362(25): 2389-98. doi: 10.1056/NEJMc1000274.
6. Laschke M.W., Giebels C., Menger M.D. Vasculogenesis: a new piece of the endometriosis puzzle. *Hum. Reprod. Update.* 2011; 17(5): 628-36. doi: 10.1093/humupd/dmr023.
7. Orazov M.R., Nosenko O.M. Innervacionnyj apparat i neyro-tkanevyje otnoshenija v miometrii u pacientok s adenomiozom. *Reproduktivnaya endokrinologiya.* 2014; 6: 79-84. (in Russian)
8. Demir R., Yaba A., Huppertz B. Vasculogenesis and angiogenesis in the endometrium during menstrual cycle and implantation. *Acta Histochem.* 2010; 112: 203-14. doi:10.1016/j.acthis.2009.04.004.
9. Makanya A.N., Hlushchuk R., Djonov V.G. Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling. *Angiogenesis.* 2009; 12: 113-23. doi:10.1007/s10456-009-9129-5.
10. Murasawa S., Asahara T. Endothelial progenitor cells for vasculogenesis. *Physiology (Bethesda).* 2005; 20: 36-42.
11. Bogoslovsky T., Spatz M., Chaudhry A., Maric D., Luby M., Frank J. et al. Stromal-derived factor-1[alpha] correlates with circulating endothelial progenitor cells and with acute lesion volume in stroke patients. *NINDS Natural History of Stroke Investigators.* 2011; 42(3): 618-25. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.596007.
12. Vodolazkaia A., Yesilyurt B.T., Kyama C.M., Bokor A., Schols D., Huskens D. et al. Vascular endothelial growth factor pathway in endometriosis: genetic variants and plasma biomarkers. *Fertil. Steril.* 2016; Jan 7. pii: S0015-0282(15)02185-8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.12.016.
13. Nagy J.A., Benjamin L., Zeng H., Dvorak A.M., Dvorak H.F. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis.* 2008; 11(2): 109-19. doi: 10.1007/s10456-008-9099-z.
14. Barcena de Arellano M.L., Arnold J., Lang H., Vercellino G.F., Chiantera V., Schneider A. et al. Evidence of neurotrophic events due to peritoneal endometriotic lesions. *Cytokine.* 2013; 62(2): 253-61. doi: 10.1016/j.cyto.2013.03.003.
15. Popov Je.N., Oparina T.I., Prokopenko V.M., Stepanov M.G. Kliniko-patogeneticheskoe obosnovanie kombinirovannogo lechenija giperplasticheskikh processov matki. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney.* 2010; 4: 71-5. (in Russian)
16. Mackenzie F., Ruhrberg C. Diverse roles for VEGF-A in the nervous system. *Development.* 2012; 139: 1371-80. doi:10.1242/dev.072348.
17. Mani N., Khaibullina A., Krum J.M., Rosenstein J.M. Astrocyte growth effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) application to perinatal neocortical explants: receptor mediation and signal transduction pathways. *Exp. Neurol.* 2005; 192: 394-406. doi:10.1016/j.expneurol.2004.12.022.
18. Kuruvilla R., Zweifel L.S., Glebova N.O., Lonze B.E., Valdez G., Ye H. et al. A neurotrophin signalling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of TrkA trafficking and retrograde signalling. *Cell.* 2004; 118: 243-55. doi:10.1016/j.cell.2004.06.021.
19. Long H., Sabatier C., Ma L., Plump A., Yuan W., Ornitz D.M. et al. VEGF-A and Semaphorin3A: modulators of vascular sympathetic innervation. *Dev. Biol.* 2009; 334: 119-32. doi:10.1016/j.ydbio.2009.07.023.
20. Marko S.B., Damon D.H. VEGF promotes vascular sympathetic innervation. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2008; 294: 2646-52. doi:10.1152/ajpheart.00291.2008.
21. Ruiz de Almodovar C., Fabre P.J., Knevels E., Coulon C., Segura I., Haddick P.C. et al. VEGF mediates commissural axon chemoattraction through its receptor Flk1. *Neuron.* 2011; 70: 966-78. doi:10.1016/j.neuron.2011.04.014.
22. Erskine L., Reijntjes S., Pratt T., Denti L., Schwarz Q., Vieira J.M. et al. VEGF signaling through neuropilin 1 guides commissural axon crossing at the optic chiasm. *Neuron.* 2011; 70: 951-65. doi:10.1016/j.neuron.2011.02.052.
23. Fuh G., Garcia K.C., de Vos A.M. The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 26690-26695.
24. Wang L., Zeng H., Wang P., Soker S., Mukhopadhyay D. Neuropilin-1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-dependent endothelial cell migration. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 48848-60. doi:10.1074/jbc.M310047200.
25. Wang L., Dutta S.K., Kojima T., Xu X., Khosravi-Far R., Ekker S.C. et al. Neuropilin-1 modulates p53/caspases axis to promote endothelial cell survival. *PLoS One.* 2007; 2: e1161. doi:10.1371/journal.pone.0001161.
26. Geretti E., Shimizu A., Klagsbrun M. Neuropilin structure governs VEGF and semaphorin binding and regulates angiogenesis. *Angiogenesis.* 2008; 11: 31-9. doi:10.1007/s10456-008-9097-1.
27. Hansen-Algenstaedt N., Algenstaedt P., Schaefer C., Hamann A., Wolfram L., Cinguz G. et al. Neural driven angiogenesis by overexpression of nerve growth factor. *Histochem. Cell Biol.* 2006; 125: 637-49. doi:10.1007/s00418-005-0111-z.
28. Zhang G., Dmitrieva N., Liu Y., McGinty K.A., Berkley K.J. Endometriosis as a neurovascular condition: estrous variations in innervation, vascularization, and growth factor content of ectopic endometrial cysts in the rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2008; 294: 162-11.

Поступила 17.11.15

Сведения об авторах:

Оразов Мекан Рахимбердыевич, канд. мед. наук, доцент каф. акушерства и гинекологии с курсом перинатологии РУДН, e-mail: otekkan@mail.ru

Носенко Елена Николаевна, доктор мед. наук, проф., каф. акушерства и гинекологии Одесского национального медицинского университета, отрасль специализации — акушерство и гинекология, 65082, Украина, г.Одесса, пер. Валиховский, 2; e-mail: nosenko.olena@gmail.com

Хныченко Л.К., Окуневич И.В., Лосев Н.А., Сапронов Н.С.

Исследование гиполипидемического свойства н-холинолитика бензогексония в эксперименте

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», отдел нейрофармакологии, 197376, Санкт-Петербург, ул. акад. И.П. Павлова, д. 12

Методика. Опыты проведены на 150 беспородных самцах крыс (230–250 г). Для моделирования дислипидемии (ДЛП) использовали 3 модели: однократное внутривентральное введение детергента тритона WR-1339; введение этанола; содержание на специальной гиперхолестеринемической (ГХС) диете в течение 21 дня. Животные были разделены на 4 группы: интактные; модель; бензогексоний + модель; гемфиброзил + модель. Крысы получали перорально бензогексоний (20 мг/кг) и препарат сравнения гемфиброзил (50 мг/кг). Определяли содержание общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) в пробах сыворотки крови и печени, ОХС в аорте. Показатели ОХС, ТГ и ХС ЛПВП анализировали стандартизированными методами спектрофотометрически.

Результаты. Установлено, что в группе крыс, которым на фоне кормления ГХС вводили бензогексоний, в сыворотке крови снижалась концентрация ОХС и ТГ, а содержание ХС антиатерогенных ЛПВП увеличивалось. В печени уменьшался уровень ОХС и ТГ, в аорте ОХС ($p < 0.05$). Расчетный индекс атерогенности (ОХС — ХС ЛПВП / ХС ЛПВП) снижался.

Обсуждение. Полученные результаты свидетельствуют, что пероральное введение н-холинолитика бензогексония оказывает гиполипидемическое действие, проявляющееся снижением содержания липидов в сыворотке крови, печени и аорте.

Ключевые слова: холинергическая система; бензогексоний; дислипидемия.

Для цитирования: Хныченко Л.К., Окуневич И.В., Лосев Н.А., Сапронов Н.С. Исследование гиполипидемического свойства н-холинолитика бензогексония в эксперименте. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016; 60(1): 36–39

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Khnychenko L.K., Okunevich I.V., Losev N.A., Saponov N.S.

Hypolipidemic activity of N-cholinergic antagonist Benzohexonium in the experiments

FSBSI «IEM» Department of Neuropharmacology, Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of Experimental Medicine»; 12, ul. Akademika Pavlova, St. Petersburg, 197376, Russia

Methods: Experiments were carried out on outbred albino male rats ($n = 150$, 230–250 g). For modeling dislipoproteinemia (DLP) we used 3 models: single intraperitoneal injection of the detergent triton WR-1339; administration of ethanol; maintenance on a special hypercholesterolaemic diet (HD) during 21 days. Animals were divided into four groups: normal control, model group, gemfibrozil (Gfb) group, benzohexonium (Benz) group. Rats received per os benzohexonium (20mg/kg), reference drug gemfibrozil (50 mg/kg). We determined content of total cholesterol (TCh), triglycerides (TG) in samples of blood serum and liver, TCh in aorta. TCh, TG and Ch-HDL were analyzed spectrophotometrically using of standardized methods.

Results: Compared with model group the contents of TCh, TG in serum and liver were significantly decreased in model + Benz group, whereas Ch-HDL was raised in rats fed special HD ($P < 0.05$). Calculated index of atherogeneity (TCh — Ch-HDL) / (Ch-HDL) showed the positive effect.

Conclusion: The results obtained were shown the hypolipidemic activity of N-cholinergic antagonist Benzohexonium (20 mg/kg) lowered the content of lipids in blood, liver, and aorta.

Keywords: cholinergic system; benzohexonium; dislipoproteinemia

For citation: Khnychenko L.K., Okunevich I.V., Losev N.A., Saponov N.S. Hypolipidemic activity of N-cholinergic antagonist Benzohexonium in the experiments. Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya. 2016; 60(1): 36–39. (In Russian).

For correspondence: Ludmila K. Khnychenko, Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher work «Federal

State Budgetary Scientific Institution «Institute of Experimental Medicine»; 12, ul. Akademika Pavlova, St. Petersburg, 197376, Russian Federation, e-mail: Ludmila.Konst83@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Нарушение липидного и липопротеинового обмена тесно связано с прогрессированием гипертонической болезни, ишемической болезни сердца, атеросклероза и их осложнений [1—3]. Имеются доказательства чувствительности системы липолиза к холинергической стимуляции [4—6]. Так, в опытах на кроликах установлено, что введение ацетилхолина в ретикулярную формацию среднего мозга способствуют формированию атеросклеротического процесса в аорте [7], а инъекции н-холиноблокатора периферического действия бензогексоний эффективно предотвращают подъем уровня свободных жирных кислот (СЖК) в ответ на иммобилизацию крыс [8]. Известно, что бензогексоний применяется в клинике при бронхоспазмах, спазмах периферических сосудов, для купирования гипертонических кризов, для контролируемой гипотензии [9—11].

Цель исследования — изучение влияния н-холинолитика бензогексоний на изменение показателей липидного обмена в условиях экспериментальной дислипотеинемии.

Методика

Опыты проведены на 150 нелинейных белых крысах-самцах массой 230—250 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении, свободном доступе к корму и питьевой воде.

Бензогексоний (ЛД₅₀ при пероральном введении на крысах 520 мг/кг) исследовали в дозе 20 мг/кг. Эта доза подобрана из нескольких (5, 10, 20, 25, 30 мг/кг) использованных в предварительных опытах с хроническим введением препарата как оптимально эффективная и не вызывающая побочных явлений. Для сравнения использовали известное гиполлипидемическое средство гемфиброзил в оптимальной для крыс дозе (50 мг/кг) в соответствии с методическими рекомендациями [12]. Гиполлипидемическое действие гемфиброзила обусловлено способностью преимущественно снижать уровень атерогенных липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП), включающих триглицериды (ТГ) [1].

Во всех опытах животные делились на 4 группы: 1-я — интактные; 2-я, 3-я, 4-я — опытные (с моделированной дислипотеинемией). Крысам 3-й группы вводили бензогексоний (20 мг/кг, субстанция, Россия), 4-й — гемфиброзил (50 мг/кг, субстанция, США) перорально через зонд.

Для индуцирования дислипотеинемии у крыс использовали: тритоновую гиперлипидемию (ГЛП), алкогольную гипертриглицеридемию (ГТГ) и алиментарную

дислипотеинемии (ДЛП) в соответствии с Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению фармакологических веществ» [12].

1. ГЛП вызывали однократным внутривенным введением детергента — тритона WR-1339 (225 мг/кг массы тела) [1, 12]. Эта скрининговая модель характеризуется быстрым и значительным увеличением уровня липидов в крови. Бензогексоний или гемфиброзил вводили одновременно с тритоном. Через 10 ч животных декапитировали и в сыворотке крови определяли содержание общего холестерина (ОХС) и триглицеридов (ТГ).

2. ГТГ моделировали однократным пероральным (через зонд) введением этанола (9 г/кг массы тела) в виде 50% раствора. Одним из определяющих моментов в развитии алкогольной гипертриглицеридемии является жировое повреждение печени. Бензогексоний или препарат сравнения крысы получали предварительно (до введения этанола) в течение 5 сут. Предварительное введение исследуемых веществ направлено на насыщение ими органов, связанных с метаболизмом липидов — печени и жировой ткани [12]. Через 8 ч после введения этанола животных декапитировали. В сыворотке крови и ткани печени определяли содержание липидов.

3. Алиментарную ДЛП индуцировали содержанием крыс на гиперхолестеринемической диете (ГХС), включающей дополнительно к стандартному рациону: 7,5% холестерина (ХС), 45% смеси животных жиров и подсолнечного масла (2:1), 500000 ЕД витамина D₃ в течение 21 сут. Животным опытных групп (3-й и 4-й) одновременно с кормлением ГХС ежедневно однократно вводили бензогексоний или препарат сравнения гемфиброзил соответственно. На 22-е сут. эксперимента перед забоем (за 18 ч) животных лишали пищи [12].

В сыворотке крови крыс определяли уровень общего холестерина (ОХС), ХС антиатерогенных липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), ТГ с помощью наборов реактивов на основе унифицированных методов согласно инструкции производителя (Vital Diagnostics, Россия). Величину индекса атерогенности рассчитывали по формуле А.Н. Климова (ОХС — ХС ЛПВП / ХС ЛПВП) [1].

Липиды аорты (ОХС) и печени (ОХС, ТГ) экстрагировали хлороформной смесью или изопропанолом соответственно, в экстрактах определяли содержание липидов [13].

Статистический анализ результатов исследования проведен с использованием пакета программ SPSS 11.5 [14]. Средние значения показателей сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA test) при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования (табл. 1) показали, что через 10 часов после однократной инъекции детергента — тритона WR-1339 в сыворотке крови крыс возросла концентрация ОХС и ТГ в 5 и 12 раз соответственно в отличие от таковой у интактных животных, свидетельствующая о развитии значительной гиперлипидемии. У животных, которые одновременно с детергентом получали бензогексоний, нарушения липидного профиля крови становились менее выраженными: содержание ОХС и ТГ снижалось (на 36,8% и 43,6% соответственно) по сравнению с животными с гиперлипидемией (группа 2). Полученные результаты указывают на гиполлипидемическое свойство тестируемого препарата.

Из данных табл. 2 видно, что у крыс, через 8 ч после введения этанола, уровень ТГ в сыворотке крови увеличивался в 5,6 раза, а в печени — в 3,2 раза, что подтверждает развитие гипертриглицеридемии. Концентрация ТГ в крови и в печени животных, которые предварительно получали бензогексоний (группа 3) на 66,7% и 28,7% соответственно, оказалась ниже, чем у гипертриглицеридемических животных

(группа 2), что свидетельствует о гипотриглицеридемическом эффекте исследуемого препарата.

Результаты, полученные на скрининговых моделях ДЛП (ГЛП и ГТГ), явились основанием для более детального изучения гиполлипидемической активности бензогексония на специфической модели — хронической алиментарной ДЛП у крыс, которая характеризуется увеличением содержания липидов в крови, печени и аорте. Из результатов, представленных в табл. 3, видно, что у крыс, содержащихся на ГХС диете, увеличивался уровень ОХС и ТГ в сыворотке крови (в 2,2 и 2,8 раза), в печени (в 2,5 и 4,8 раза) соответственно и ОХС в аорте (1,9 раза). Одновременно снижалась концентрация ХС антиатерогенных ЛПВП (в 2 раза) по сравнению с интактными животными. Индекс атерогенности (ИА) возрастал более чем в 6 раз. Иная картина наблюдалась в группе крыс, которым на фоне кормления ГХС вводили бензогексоний. Так, в сыворотке крови снижалась концентрация ОХС (в 1,6 раза) и ТГ (в 3 раза), а содержание ХС антиатерогенных ЛПВП увеличивалось (в 2 раза). В результате снижения ОХС и повышения ХС ЛПВП величина холестерина ИА сокращалась в 4 раза по сравнению с таковой у крыс, получавших только ГХС диету. Кроме того, в печени уменьшался уровень ОХС и ТГ в 2,4 и 2,2 раза соответственно. В ткани аорты в 1,8 раза уменьшалось содержание ОХС. Следует отметить, что у животных, получавших одновременно с ГХС диетой бензогексоний, не наблюда-

Таблица 1

Влияние бензогексония на изменение уровня липидов в сыворотке крови крыс при моделировании тритоновой гиперлипидемии (ГЛП)

№ п/п	Группы животных	Липиды в сыворотке крови (ммоль/л)	
		ОХС	ТГ
1	Интактные	1,6 ± 0,06	0,7 ± 0,04
2	Тритон WR-1339	8,7 ± 0,43*	8,5 ± 0,18*
3	Бензогексоний + тритон WR-1339	5,5 ± 0,85**	4,8 ± 0,68**
4	Гемфиброзил + тритон WR-1339	5,0 ± 0,50**	4,2 ± 0,32**

Примечание. * — различия статистически значимы по сравнению с группой 1 при $p < 0,05$; # — различия статистически значимы по сравнению с группой 2 при $p < 0,05$.

Таблица 2

Влияние бензогексония на изменение уровня триглицеридов (ТГ) в сыворотке крови и ткани печени при моделировании алкогольной гипертриглицеридемии (ГТГ)

№ п/п	Группы животных	ТГ	
		Сыворотка крови (ммоль/л)	Печень (мг/г сырой ткани)
1	Интактные	0,58 ± 0,03	4,7 ± 0,8
2	Этанол	3,3 ± 0,21*	15,14 ± 0,92*
3	Бензогексоний + этанол	1,10 ± 0,08**	10,8 ± 0,51**
4	Гемфиброзил + этанол	0,95 ± 0,03**	10,1 ± 0,73**

Примечание. * — различия статистически значимы по сравнению с группой 1 при $p < 0,05$; # — различия статистически значимы по сравнению с группой 2 при $p < 0,05$.

Влияние бензогексония на изменение липидных показателей в сыворотке крови, печени, аорте и величину индекса атерогенности (ИА) при алиментарной дислипидотеинемии (ДЛП) у крыс

№ п/п	Группы животных	Липиды в сыворотке крови (ммоль/л)			ИА	Липиды в ткани (мг/г сырой ткани)		
		ОХС	ТГ	ХС ЛПВП		Печень		Аорта
						ОХС	ТГ	ОХС
1	Интактные	1,55 ± 0,07	0,67 ± 0,03	0,60 ± 0,06	1,6	2,3 ± 0,1	3,5 ± 0,2	1,9 ± 0,1
2	ГХС диета	3,51 ± 0,05*	1,90 ± 0,05*	0,30 ± 0,01*	10,7	5,9 ± 0,1*	17,0 ± 0,5*	3,7 ± 0,5*
3	Бензогексоний + ГХС диета	2,14 ± 0,2 [#]	0,60 ± 0,01 [#]	0,61 ± 0,06 [#]	2,5	2,4 ± 0,1 [#]	7,6 ± 0,4 [#]	2,3 ± 0,2 [#]
4	Гемфиброзил + ГХС диета	2,70 ± 0,05 [#]	0,63 ± 0,03 [#]	0,62 ± 0,05 [#]	3,3	2,80 ± 0,1 [#]	7,5 ± 0,6 [#]	2,1 ± 0,2 [#]

Примечание. * — различия статистически значимы по отношению к 1-й группе при $p < 0,05$; [#] — различия достоверны по отношению ко 2-й группе при $p < 0,05$

лось статистически значимых различий в содержании ОХС, ТГ, ХС ЛПВП в крови, ОХС и ТГ в печени и ОХС в аорте по сравнению с группой животных, получавших гемфиброзил.

Таким образом, в условиях экспериментальной дислипидотеинемии на крысах установлено, что пероральное введение н-холинолитика бензогексония оказывает гиполлипидемическое действие, проявляющееся в угнетении степени развития ДЛП, снижении содержания липидов в сыворотке крови, печени и аорте. Представленные результаты исследования явились основанием для получения патента РФ на «Средство, обладающее гиполлипидемическими свойствами» [15].

References

1. Klimov A.N., Nikulcheva N.G. *Lipids and lipoproteins metabolism and its damage. [Obmen lipidov i lipoproteidov i ego narusheniya]* St. Petersburg: Piter; 1999. (in Russian)
2. Siurin A.A., Kobozev G.V., Kulagin Iu.I., Safronova L.G., Anikin E.I., Kabeliuzhenko S.B. et al. Lipid peroxidation and change in the lipid fraction of plasma in patients with hypertonic disease. *Vopr Med Khim.* 1991; 37(2): 26-8. (in Russian)
3. Pena V.B., Bonini I.C., Antonini S.S. et al. Alpha 7-type acetylcholine receptor localization and its modulation by nicotine and cholesterol in vascular endothelial cells. *J. Cell Biochem.* 2011; 112 (11): 3276-88.
4. Andersson K., Arner P. Systemic nicotine stimulates human adipose tissue lipolysis through local cholinergic and catecholaminergic receptors. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2001; 25(8): 1225-232.
5. Barrantes F.J. Lipid effects on nicotinic acetylcholine receptor gating and kinetics: a structural-functional correlation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1993; 26(6): 553-71.
6. Inanaga K., Ichiki T., Miyazaki R., Takeda K., Hashimoto T., Matsuura H. et al. Acetylcholinesterase inhibitors

attenuate atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice. *Atherosclerosis.* 2010; 213(1): 52-8.

7. Danilov G.E., Ibatov A.D. Experimental model of atherosclerosis induced by administration of acetylcholine into the reticular formation of the midbrain. *Bull Eksp Biol Med.* 1991; 111(4): 361-63. (in Russian)

8. Denisenko P.P. *Role of cholinergic systems in regulatory processes.* Moscow: Meditsina; 1980. (in Russian)

9. Mashkovsky M.D. *Medicines.* 16nd ed. Moscow: New wave; 2014. (in Russian)

10. Losev N.A., Sapronov N.S., Khnychenko L.K., Shabanov P.D. *Farmakologiya novykh holinergicheskikh sredstv (farmakologiya-klinike) [Farmakologiya novykh holinergicheskikh sredstv (farmakologiya-klinike)]* SPb: Art-Ekspress, 2015. (in Russian)

11. Khnychenko L.K., Bulion V.V., Sitnikova I.I., Losev N.A. New approach to treatment of a hypertensive illness. *Vrach.* 1994; (4): 25-6. (in Russian)

12. Mironov A.N., Bunatjan N.D. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv]* M.: Grif i K; 2012. (in Russian)

13. Okunevich I.V., Khnychenko L.K., Shabanov P.D. Vliyanie gipoksena na izmenenie pokazatelej lipidnogo obmena v usloviyakh jeksperimental'noj dislipidoteinemii. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii.* 2014; (3): 26-9. (in Russian)

14. Bryul A., Tsefel P. *Art of information processing of statistical data and restoration of the hidden regularities. Искусство обработки информации статистических данных и восстановление скрытых закономерностей [Iskusstvo obrabotki informatsii statisticheskikh dannykh i vosstanovlenie skrytykh zakonernostey]* Moscow — St. Petersburg — Kiev: Dia Soft; 2002. (in Russian)

15. Okunevich I.V., Khnychenko L.K., Losev N.A., Sapronov N.S. The means possessing hypolipidemic properties. Patent 2392933, RF; 2010. (in Russian)

Поступила 11.10.14

Сведения об авторах:

Окуневич Ирина Викторовна (Okunevich I.V.) канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

Лосев Николай Андреевич (Losev N.A.), доктор мед. наук, профессор, рук. лаб. химии и фармакологии лекарственных веществ

Сапронов Николай Сергеевич (Sapronov N.S.), доктор мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, гл. науч. сотр., e-mail: sns@iemrams.ru

Оразов М.Р.¹, Радзинский В.Е.¹, Носенко Е.Н.²

Роль воспаления и иммунореактивности в развитии болевого синдрома при аденомиозе

¹ — ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

² — «Одесский национальный медицинский университет» МОЗ Украины, 65082, Украина, Одесса, пер. Валиховский, 2.

Цель исследования: анализ роли иммуновоспалительных процессов в развитии аденомиоза и ассоциированного с ним болевого синдрома.

Методика. Для морфологического исследования использовали фрагменты стенок 56 маток, полученных после гистерэктомии у пациенток с тазовой болью на фоне диффузного аденомиоза II—III степени, и 30 пациенток с безболевым формой аденомиоза. Для идентификации, оценки количества и пространственного распределения макрофагов, Т-хелперов и натуральных киллеров использовали МАТ к CD68, CD4, CD56 соответственно.

Результаты исследования. Показано статистически значимое возрастание экспрессии CD68 ($49,3 \pm 2,3$ против $21,2 \pm 1,7$ усл. ед., $p < 0,01$), CD56 ($47,4 \pm 2,7$ против $17,2 \pm 1,8$ усл. ед., $p < 0,01$) и CD4 ($52,1 \pm 2,2$ против $19,9 \pm 2,5$ усл. ед., $p < 0,01$) у пациенток с болевой формой аденомиоза в зонах роста эктопического эндометрия, в периваскулярных регионах миометрия по сравнению с таковыми зонами у женщин с безболевым аденомиозом.

Выводы. Аденомиоз является хроническим воспалительным заболеванием, сопровождающимся дисфункцией маточной иммунной реактивности. Иммуновоспалительные процессы в матке при аденомиозе способствуют персистенции и росту эндометриоидных имплантов. При аденомиозе, ассоциированном с синдромом хронической тазовой боли, наблюдается повышение количества активированных макрофагов, натуральных киллерных клеток и Т-хелперов в периваскулярных регионах и в зонах ремоделирования миометрия, являющихся местом локализации, что приводит к усилению нейрогенного воспаления и чувствительности ноцицепторов, активации периферических нервных волокон и к генерации боли.

Ключевые слова: аденомиоз; тазовая боль; воспаление; макрофаги; натуральные киллерные клетки; Т-хелперы

Для цитирования: Оразов М.Р., Радзинский В.Е., Носенко Е.Н. Роль иммуновоспалительной реактивности в развитии болевого синдрома при аденомиозе. Патологическая физиология и экспериментальная терапия, 2016; 60(1): 40—44

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов.

Благодарность. Авторы выражают огромную благодарность в проведении морфологических и иммуногистохимических исследований д.мед.н., профессору кафедры гистологии и эмбриологии Донецкого медицинского университета МОЗ, профессору Сулаевой Оксане Николаевне и зав. патологоанатомического отделения ФГБУНИИ урологии МЗРФ Ефремову Геннадию Дмитриевичу.

Orazov M.R.¹, Radzinskiy V.E.¹, Nosenko O.M.²

The role of inflammatory and immune reactivity in developing pain in adenomyosis

¹ — Russian University of Peoples' Friendship, 117198, Moscow, str. Miklukho-Maklaya, 6

² — Odessa National Medical University, Ukraine, 65082, Ukraine, Odessa, lane Valihovsky, 2

Objective: to analyze the role of inflammatory and immune reactivity in the development of adenomyosis and its associated pain.

Methods. For morphological studies it were using fragments of walls of 56 uterus received after hysterectomy in patients with pelvic pain on a background of diffuse adenomyosis II—III degree, and 30 patients with painless form of adenomyosis. To identify, evaluate the amount and spatial distribution of macrophages, T-helper cells and natural killer cells it was using MAbs to CD68, CD4, CD56 respectively.

The results of the study showed a significantly high expression of CD68 ($49,3 \pm 2,3$ vs. $21,2 \pm 1,7$ conv. units, $p < 0,01$), CD56 ($47,4 \pm 2,7$ vs. $17,2 \pm 1,8$ conv. units, $p < 0,01$, $p < 0,05$) and CD4 ($52,1 \pm 2,2$ vs. $19,9 \pm 2,5$ conv. units, $p < 0,01$) in patients with painful form of adenomyosis in the regions of ectopic endometrium and in the regions of perivascular growth in myometrium compared to those areas in women with painless adenomyosis.

Conclusions: Adenomyosis is a chronic inflammatory disease accompanied by dysfunction of the uterine immune re-

Для корреспонденции: Оразов Мекан Рахимбердыевич, канд. мед. наук, доцент кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии Российского университета дружбы народов, e-mail: omekan@mail.ru

activity. Inflammatory and immune processes in the uterus with adenomyosis contribute to the persistence and growth of endometrial implants. In adenomyosis, associated with chronic pelvic pain syndrome, there is increase in the number of activated macrophages, natural killer cells and T-helper cells in the perivascular regions and in areas of remodeling of the myometrium are carriers of the nerves, which leads to increased neurogenic inflammation and sensitivity of nociceptors, activation of peripheral nerve fibers and the generation of pain.

Key words: adenomyosis; pelvic pain; inflammation; macrophages; natural killer cells; T-helper cells

For citation: Orazov, M.R., Radzinskiy V.E., Nosenko O.M. The role of inflammatory and immune reactivity in developing pain in adenomyosis. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2016; 60(1): 40–44.

For correspondence: Orazov Mekan Rahimberdievich, e-mail: omekan@mail.ru

Thanks to: The authors express gratitude to the conduct morphological and immunohistochemical studies M.D. Professor Department of Histology and Embryology of Zaporizhia National Medical University of Ministry of Health of Ukraine, Professor Sulaieva Oksana Nikolaeвна and the Head of Department of pathology of Rresearch Institute of Urology Efremov Gennady Dmitrievich.

Общеизвестно, что эндометриоз развивается на фоне нейроиммуногормональной дисфункции [1, 2]. Несмотря на то, что эндометриоз, как правило, считается гормональнозависимым заболеванием, существует точка зрения, что дисфункция иммунной системы может быть одним из возможных факторов развития эндометриоза. Адекватно функционирующая иммунная система элиминирует клетки эндометрия, располагающиеся за пределами слизистой оболочки матки. У пациенток с эндометриозом дисфункция иммунной реактивности позволяет эктопическому эндометрию пролиферировать и внедряться в подлежащие ткани. Клетки эктопического эндометрия вызывают декструктивные изменения в миометрии и развитие воспаления. [3, 4], которая сопровождается изменением фенотипических свойств макрофагов, усилением В-клеточного иммунного ответа, появлением аутоантител к собственному эктопическому эндометрию и снижением активности и цитотоксичности естественных киллеров (НК). Экспериментально доказано, что клетки эндометрия могут имплантироваться только в регионах с измененными клеточно-опосредованными иммунными реакциями [5].

С другой стороны, возможно, что иммунологические изменения вокруг эндометриозных очагов лишь вторичны по отношению к развитию эндометриоза [6].

Изменения иммунной реактивности при аденомиозе подтверждает ряд исследований. Исследование эластазы лейкоцитов и альфа-1-ингибитора протеиназы у пациентов с различными стадиями аденомиоза выявило активацию реакций врожденного иммунитета у всех больных с аденомиозом [7]. Было показано нарушение T (H) 17-Treg баланса как в периферической крови, так и в матках больных с диффузной и очаговой формами аденомиоза [9]. Отмечено, что наличие диффузного или типа «аденомиома» аденомиоза связано с заметным увеличением плотности макрофагов и НК-клеток в строме эндометрия, по сравнению с очаговым аденомиозом [10].

Воспалительный процесс, при аденомиозе, сопровождается высвобождением различных аллогенов, что

способствует функциональным и структурным изменениям ноцицепторов в месте альтерации и вызывает повышение их возбудимости (периферическую сенсибилизацию) [11]. Интерлейкин-1 (IL-1), продуцируемый активированными макрофагами, индуцирует синтез простагландинов, избыточная концентрация которых может быть ответственна за возникновение боли [12].

Работы, посвященные иммуногистохимическому изучению иммунновоспалительного аллогенеза при аденомиозе малочисленны.

Цель исследования — изучение роли иммунновоспалительных процессов в развитии аденомиоза и ассоциированного с ним болевого синдрома.

Методика

Объектом исследования служили 56 маток, полученных после гистерэктомии у пациенток с диффузным аденомиозом II—III степени, сопровождающимся выраженным болевым синдромом, и 30 маток пациенток с безболевым формой аденомиоза (контроль). Пациентки были прооперированы в пролиферативную фазу цикла.

Полученные после гистерэктомии образцы стенки матки, включающие эндометрий и миометрий обрабатывали общепринятыми в гистологической практике методами и готовили парафиновые срезы толщиной 5 мкм. Общую морфологическую оценку проводили при окраске гематоксилином и эозином. Для оценки характера межклеточных коопераций различные линии клеток визуализировали иммуногистохимически. Для идентификации, оценки количества и пространственного распределения макрофагов, T-хелперов и НК использовали мышинные антитела (MAT): к CD68, Macrophage (клон PG-M1, «Diagnostic BioSystems», США); CD4 (клон EP204, «Diagnostic BioSystems», США); CD56 (клон 123C3.D5, «Diagnostic BioSystems», США) соответственно. При иммунофенотипировании макрофагов использовали

в качестве маркера зрелых и активированных макрофагов CD68; CD4 — как маркер Т-хелперов; CD56 — как маркер NK-клеток.

Оценивали удельную плотность иммунопозитивных клеток в условных единицах (количество окрашенных в коричневый цвет клеток на тысячу стромальных клеток).

Для «демаскировки» антигенов регидратированные срезы подвергали термической обработке в растворе Target Retrieval Solution (ДАКО, Дания) с использованием бытовой микроволновой печи Samsung CE118KFR при 450W 3 раза по 3,5 мин. После блокирования эндогенной пероксидазной активности пероксидазным блоком (ДАКО, Дания) и неспецифического связывания белков протеиновым блоком (ДАКО, Дания) наносили первичные антитела (RTU). Визуализацию первичных антител проводили с помощью полимерной системы детекции DAKO EnVision+, Дания. В качестве субстрата для пероксидазы хрена использовали DAB+ (ДАКО, Дания). Препараты докрашивали гематоксилином Майера. Съемку осуществляли на микроскопе Olympus BX51 с цифровой камерой DP70 (Olympus, Япония). Далее окрашенные срезы заключали в полусинтетическую оптически прозрачную среду Permanent Mounting Medium (ДАКО, Дания).

Комплексный морфометрический анализ, проводили с помощью специального программного обеспечения ImageTool version 3.0. и графического редактора Adobe Photoshop CS4 Extended v.11.0.1.

Статистическую обработку материала проводили с помощью программы «Statistica for Windows, 7».

Результаты и обсуждение

Как показали результаты исследования лейкоцитарная инфильтрация в эндометрии и в миометрии при болевой форме аденомиоза была более значительно выражена, чем при безболевой. Инфильтраты располагались не только в зонах вокруг очагов аденомиоза, но и свободно в строме — между пучками гладких миоцитов. Причем, если в эндометрии лейкоцитарная инфильтрация носила преимущественно диффузный характер, то в миометрии наблюдались преимущественно периваскулярные скопления лимфоцитов. При этом количество CD68-позитивных клеток в эктопическом эндометрии больных с болевой формой аденомиоза было значимо выше ($49,3 \pm 2,3$ усл. ед.), чем при безболевой ($21,2 \pm 1,7$ усл. ед., $p < 0,01$). Характерно, что при этом макрофаги определялись преимущественно в периваскулярных регионах, хотя незначительная часть их обнаруживалась вблизи маточных желез и даже в их просвете. Особенно многочисленными оказались

CD68-позитивные клетки в участках эктопического роста эндометрия. Здесь макрофаги всегда обнаруживались не только в периваскулярном регионе, но и в зонах инвазии маточных желез и характеризовались высокой интенсивностью метки. Полученные данные коррелируют с результатами исследования [13], согласно которому аденомиозная ткань содержит значительно больше CD68-позитивных клеток, чем соответствующий аутологичный эндометрий.

В ряде участков обнаруживались прямые контакты CD68-позитивных клеток с эпителием эктопических маточных желез. Однако, макрофаги выявлялись не только в очагах аденомиоза, но также в достаточном большом количестве — в самом миометрии, как вокруг крупных кровеносных сосудов мезометрии, так и в прослойках стромы между пучками гладких миоцитов. И здесь закономерно выявлялась периваскулярная локализация CD68-позитивных клеток. Кроме того, в большом количестве макрофаги присутствовали в участках лейкоцитарной инфильтрации стромы, — особенно вокруг очагов аденомиоза с признаками дистрофии и десквамации клеток. Менее многочисленными оказались свободные макрофаги, одиночно расположенные между пучками гладких миоцитов. Проведение сравнительного анализа количества макрофагов в миометрии у пациенток основной группы и группы контроля показало усиление рекрутирования данных клеток при аденомиозе, осложненном формированием синдрома тазовой боли. Причем CD68-позитивные клетки были ассоциированы не только с зонами роста эктопического эндометрия, но и с периваскулярным регионом, являющимся местом локализации нервных структур и центром процессов ремоделирования стенки матки при данной патологии, как было нами показано ранее [14].

Нервные окончания в миометрии и эндометриоидных гетеротопиях потенциально могут быть стимулированы различными воспалительными цитокинами, в том числе гистамином, серотонином, брадикинином, простагландинами, лейкотриенами, интерлейкинами, ацетилхолином, факторами роста (сосудисто-эндотелиальным (VEGF), фактором некроза опухоли, эпидермальным, тромбоцитарным, трансформирующим фактором роста- β и фактором роста нервов (NGF)). Многие из указанных выше веществ секретируются макрофагами [15]. Повышение плотности макрофагов и секретируемых ими альгоенов может быть связано с возникновением болевых ощущений у женщин с аденомиозом. Кроме того, активированные макрофаги могут способствовать росту нервных волокон вследствие увеличения продукции IL-1 β и усиления продукции NGF [16], повышения экспрессии нейротрофического фактора (brain-derived neurotropic factor

— BDNF) — ключевого фактора роста и дифференциации структур периферической нервной системы [17], интенсификации продукции VEGF, который может выступать в качестве нейротрофического фактора, стимулирующего рост нервных волокон [15, 18]. Ранее, нами было доказано статистически значимое увеличение количества сенсорных нервных структур при аденомиозе с болевым синдромом [14].

Помимо клеток неспецифического иммунитета, в эндометрии и миометрии пациенток с аденомиозом было увеличено и количество клеток специфической иммунной защиты.

Интересные результаты были получены при оценке количества и распределения НК клеток при аденомиозе, считающихся одними из наиболее многочисленных клеток в эндометрии в физиологических условиях. Большинство НК в миометрии экспрессируют CD56, который по своей природе является нейральной молекулой адгезии (NCAM-1). Аналогичная молекула экспрессируется на плазмолемме симпатических нервных волокон [19]. Более того, предполагается возможность гомотипических взаимодействий между молекулами NCAM-1, что предполагает высокую вероятность прямого взаимодействия НК с нервными волокнами.

В значительном количестве CD56-позитивные клетки выявлялись в эндометрии и миометрии пациенток с аденомиозом, сопровождающимся болевым синдромом. В эндометрии они регистрировались как под покровным эпителием, так и между железами. В отдельных участках выявлялись непосредственные контакты НК с клетками железистого эпителия, а иногда наблюдалось их интраэпителиальное расположение. Характерно, что интраэпителиальное расположение НК было ассоциировано с усиленной пролиферацией железистых эпителиоцитов. Однако более типичной была структурная колокализация НК с сосудами и стромальными элементами. Сравнительный анализ количества CD56 в миометрии у пациенток с болевой и безболевой формой аденомиоза показало статистически значимое усиление рекрутирования данных клеток при аденомиозе, осложненным формированием синдрома тазовой боли, по сравнению с безболевым фенотипом заболевания ($47,4 \pm 2,7$ и $17,2 \pm 1,8$ усл. ед. соответственно). К аналогичному заключению пришли и другие исследователи [18]. Известно, что три наиболее характерных цитокина, продуцируемых НК (IL-12, IL-15 и IL-18), являются мощными стимуляторами ангио- и нейрогенеза. Можно предположить, что повышение количества НК является одним из ведущих механизмов стимуляции ангиогенеза, предопределяющего рост нервных волокон и формирование болевого синдрома.

CD4-позитивные клетки выявлялись в большом количестве в виде диффузной сети в эндометрии, а также под покровным эпителием и в строме между железами. У части пациентов выявлена интраэпителиальная локализация CD4-позитивных клеток (Т-хелперов) между пролиферирующими эпителиоцитами маточных желез. Основная масса эндометриальных CD4-позитивных клеток выявлялась в пространствах между очагами эктопии в миометрии. Здесь Т-лимфоциты локализовались преимущественно в периваскулярных регионах — чаще одиночно, у некоторых пациентов — группами.

Высоким оказалось и количество CD4-позитивных клеток в миометрии — они располагались преимущественно между пучками гладких миоцитов, в составе стромальных элементов, а также в значительном количестве вдоль мелких сосудов миометрия. При этом количество данных клеток у больных с болевой формой аденомиоза статистически значимо превышало таковое у пациенток с безболевой — ($52,1 \pm 2,2$ против $19,9 \pm 2,5$ усл. ед. соответственно) и было сопряжено с выраженностью ремоделирования миометрия. Не исключено, что данные клетки относятся к фенотипу Т-регуляторных CD4+CD25+ лимфоцитов, которые с одной стороны обеспечивают формирование иммунологической толерантности, а с другой известны как мощные продуценты TGF- β . стимулирующего формирование миофибробластов и эпителио-мезенхимную трансформацию.

Таким образом, аденомиоз является хроническим воспалительным заболеванием, обусловленным изменением иммунной реактивности. Как известно, провоспалительные цитокины приводят к усилению нейрогенного воспаления и увеличению чувствительности ноцицепторов, активации периферических нервных структур, благодаря чему, закрепляется связь между аденомиозом и генерацией тазовой боли.

References

1. Khan K.N., Kitajima M., Hiraki K., Fujishita A., Sekine I., Ishimaru T., Masuzaki H. Changes in tissue inflammation, angiogenesis and apoptosis in endometriosis, adenomyosis and uterine myoma after GnRH agonist therapy. *Hum. Reprod.* 2010; 25(3): 642-53. doi: 10.1093/humrep/dep437.
2. Liu X., Shen M., Qi Q., Zhang H., Guo SW. Corroborating evidence for platelet-induced epithelial-mesenchymal transition and fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation in the development of adenomyosis. *Hum. Reprod.* 2016; Feb 22. pii: dew018.
3. Senturk L.M., Arici A. Immunology of endometriosis. *J. Reprod. Immunol.* 1999; 43(1): 67-83.
4. Vinatier D., Cosson M., Dufour P. Is endometriosis an endometrial disease? *Eur. Obstet. Gynecol. Biol.* 2000; 91(2): 113-25.

5. Dmowski W.P., Steele R.W., Baker G.F. Deficient cellular immunity in endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1981; 41: 377-83.
6. Kralickova M., Vetvicka V.I. Immunological aspects of endometriosis: a review. *Ann. Transl. Med.* 2015; 3(11): 153. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.06.08.
7. Sorokina A.V. Patogenez, prognozirovanie i postgenomnaja diagnostika adenomioza. diss. Moscow, 2012. (in Russian)
8. Yang J.H., Chen M.J., Chen H.F., Lee T.H., Ho H.N., Yang Y.S. Decreased expression of killer cell inhibitory receptors on natural killer cells in eutopic endometrium in women with adenomyosis. *Hum. Reprod.* 2004; 19(9): 1974-8.
9. Gui T., Chen C., Zhang Z., Tang W., Qian R, Ma X et al. The disturbance of TH17-Treg cell balance in adenomyosis. *Fertil. Steril.* 2014; 101(2): 506-14. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.10.050.
10. Tremellen K.P., Russell P., Tremellen K.P., Russell P. The distribution of immune cells and macrophages in the endometrium of women with recurrent reproductive failure. II: adenomyosis and macrophages. *J. Reprod. Immunol.* 2012; 93(1): 58-63. doi: 10.1016/j.jri.2011.12.001.
11. Moalem G., Tracey D.J. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res. Rev.* 2006; 51(2): 240-64.
12. Taylor R.N. Endometriosis. *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management.* Ed. by J.F. Strauss III, R.L. Barbieri. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2004 : 691-711.
13. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor in adenomyosis and autologous endometrium. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 2002; 9(2): 93-7.
14. Orazov M.R., Nosenko O.M. Innervacionnyj apparat i nejro-tkanevye otnoshenija v miometrii u pacientok s adenomiozom. *Reproduktivnaja endokrinologija.* 2014; 6: 79-84. (in Russian)
15. Tran L.V., Tokushige N., Berbic M., Markham R., Fraser I.S. Macrophages and nerve fibres in peritoneal endometriosis. *Hum. Reprod.* 2009; 24(4): 835-41. doi: 10.1093/humrep/den483.
16. Bandtlow C.E., Meyer M., Lindholm D., Spranger M., Heumann R., Thoenen H. Regional and cellular codistribution of interleukin 1 beta and nerve growth factor mRNA in the adult rat brain: possible relationship to the regulation of nerve growth factor synthesis. *J. Cell. Biol.* 1990; 111: 1701-11.
17. Shibata A., Zelivyanskaya M., Limoges J., Carlson K.A., Gorantla S. et al. Peripheral nerve induces macrophage neurotrophic activities: regulation of neuronal process outgrowth, intracellular signaling and synaptic function. *J. Neuroimmunol.* 2003; 142: 112-29.
18. Wang F., Shi X., Qin X., Wen Z., Zhao X., Li C. Expression of CD56 in patients with adenomyosis and its correlation with dysmenorrhea. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2015; 194: 101-5. doi: 10.1016/j.ejogrb.2015.08.027.
19. Armentero M.T., Levandis G., Bazzini E. Cerri S., Ghezzi C. et al. Adhesion molecules as potential targets for neuroprotection in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 2011; 43(3): 663-8. doi: 10.1016/j.nbd.2011.05.017.

Поступил 17.12.15

Сведения об авторах:

Радзинский Виктор Евсеевич — д.мед.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии с курсом перинатологии Российского университета дружбы народов; отрасль специализации — акушерство и гинекология; 117198, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.

Носенко Елена Николаевна — д.мед.н., профессор, профессор кафедры акушерства и гинекологии Одесского национального медицинского университета, отрасль специализации — акушерство и гинекология; адрес: 65082, Украина, г.Одесса, пер. Валиховский, 2; e-mail: nosenko.olena@gmail.com

Еркудов В.О.^{1,2}, Пуговкин А.П.¹, Верлов Н.А.³, Сергеев И.В.², Иевков С.А.⁴

Погрешность расчёта системного артериального давления с применением передаточных функций при изменении объема циркулирующей крови в остром эксперименте

¹ — ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, 194100, г. Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2

² — «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН, 199034, г. Санкт-Петербург, набережная Макарова, д. 6

³ — ФГБУ «ПИАФ», 188300, Ленинградская обл., г. Гатчина, Орлова роща

⁴ — СПб ГБУЗ «Детская городская больница № 1», 198205, г. Санкт-Петербург, ул. Авангардная, д. 14, лит. А

Цель работы — сравнение погрешности применения ПФ для оценки системного АД при обратимых изменениях ОЦК путем компенсации острой кровопотери в эксперименте.

Результаты. Показано, что в условиях моделирования кровопотери имеет место снижение жёсткости сосудов и возрастание погрешности оценки артериального давления (АД) в сонных артериях с применением передаточных функций. При компенсации ОЦК инфузией раствора полиглюкина происходило восстановление жёсткости сосудов, и погрешность оценки системного артериального давления снижалась по сравнению с кровопотерей.

Заключение. Полученные результаты могут использоваться в клинике при апробации способов неинвазивной оценки показателей системной гемодинамики.

Ключевые слова: крысы; эксперимент; системное артериальное давление; передаточные функции; кровопотеря; восстановление объема циркулирующей крови

Для цитирования: Еркудов В.О., Пуговкин А.П., Верлов Н.А., Сергеев И.В., Иевков С.А. Погрешность расчёта системного артериального давления с применением передаточных функций при изменении объема циркулирующей крови в остром эксперименте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(2): 45–49

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта.

Erkudov V.O.^{1,2}, Pugovkin A.P.¹, Verlov N.A.³, Sergeev I.V.², Ievkov S.A.⁴

Systemic errors in the estimation of systemic arterial pressure via transfer functions after experimental changes of the circulating blood volume

¹ — Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, 194100, Saint-Petersburg, Litovskaya str., 2

² — I.P. Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Science, 199034, Saint-Petersburg, Makarova nab, 6

³ — B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, 188300, Leningrad region, Gatchina, Orlova roshcha

⁴ — City Pediatric Hospital № 1, 198205, Saint-Petersburg, Avangardnaya str, 14A

The results of the experimental studies reveal the decrease of vascular rigidity with the increase of systemic error of the arterial pressure values estimated via implication of transfer functions following haemorrhage modeling in rats. Compensation of the circulating blood volume by means of dextran infusion resulted in restoration of both vascular rigidity and systemic error of estimated arterial pressure. The results can be put into medical practice as an approach for testing of non-invasive methods in cardiovascular research.

Keywords: rat; experiment; systemic arterial pressure; compensation of circulating blood volume; haemorrhage; transfer functions.

For citation: Erkudov V.O., Pugovkin A.P., Verlov N.A., Sergeev I.V., Ievkov S.A. Systemic errors in the estimation of systemic arterial pressure via transfer functions after experimental changes of the circulating blood volume. *Patologicheskaya Fiziologiya I Experimentalnaya Terapiya.* 2016; 60(2): 45–49

For correspondence: Erkudov V.O., e-mail: verkudov@gmail.com

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Одной из важнейших задач экспериментальной медицины является поиск и апробация минимально инвазивной методики оценки параметров системной гемодинамики [1] в условиях, моделирующих патологические процессы [2, 3]. Ранее нами было показано, что надежная оценка показателей системной гемодинамики с применением передаточных функций (ПФ) возможна только в относительно стабильных условиях кровообращения [4—6]. В условиях изменения объема циркулирующей крови (ОЦК) посредством нагрузки объемом (инфузия полиглюкина) либо острой кровопотери погрешность оценки системного артериального давления (АД) с применением ПФ возрастает, что требует специальных методов ее расчета [7].

Цель работы — сравнение погрешности применения ПФ для оценки системного АД при обратимых изменениях ОЦК путем компенсации острой кровопотери в эксперименте.

Методика

Эксперименты проводили в соответствии с соблюдением правил гуманного обращения с лабораторными животными [8]. В опытах на 11 крысах-самцах Вистар с массой $341,82 \pm 17,79$ г проводили синхронную регистрацию АД в сонных и бедренных артериях с помощью тензометрического электроманометра ПДП-400. После 20—30-секундной записи АД при относительно стабильных условиях гемодинамики (фон), проводилось моделирование острой кровопотери. Для этого после канюлирования бедренной артерии из артериального русла за 10—20 с посредством шприца, соединённого с катетером изымалась кровь в объеме 10% ОЦК животного, который у крыс составляет 0,05 мл/г [9]. Затем производилось восстановление ОЦК путем инфузии раствора полиглюкина через шприцевой насос Soveta SRL SEP-10s, Itali со скоростью 8,07 мл/мин. После моделирования кровопотери и восстановления ОЦК проводилась запись АД в течение 20—30 с.

Данные приводились в цифровую форму с помощью компьютерной системы сбора данных HEART-300-10. После оцифровки получали три отрезка записи мгновенных значений АД, зарегистрированных через 1 мс в течение 20—30 с. Используя эти данные, проводилась реконструкция кривых АД в сонных и бедренных артериях в условиях фона, после моделирования кровопотери и восстановления ОЦК. Для каждой из полученных кривых был рассчитан Фурье-спектр и рассчитаны ПФ в условиях фона по методике, предложенной ранее [4—7]. Рассчитанные ПФ использовались для расчета значений систолического и диастолического АД в сонных арте-

риях в условиях фона, после моделирования кровопотери и восстановления ОЦК. После этого производилось вычисление относительной погрешности (ОП) расчета систолического и диастолического АД с применением ПФ по формуле (1):

$$\text{ОП}\% = \frac{\text{АД}_{\text{прям}} - \text{АД}_{\text{пф}}}{\text{АД}_{\text{прям}}} \cdot 100, \quad (1)$$

где:

ОП — относительная погрешность;

$\text{АД}_{\text{прям}}$ — значения АД, полученные в результате прямого измерения;

$\text{АД}_{\text{пф}}$ — значения АД, рассчитанные с применением ПФ.

Расчет и применение передаточных функций производился с использованием библиотек функций программы MATLAB R2012b.

Для контроля жесткости сосудистого русла проводилась оценка скорости распространения пульсовой волны (СРПВ). Для этого определяли время задержки появления пульсовой волны (ВЭПВ) в бедренной артерии относительно сонной. После окончания каждого опыта производилось вскрытие умерщвленного животного и измерение длины сосудистого русла между датчиками АД в сонных и бедренных артериях. Для расчета СРПВ значения длины сосудистого русла в каждом опыте делили на значения ВЭПВ.

Значения АД и СРПВ до и после моделирования кровопотери, после моделирования кровопотери и инфузии полиглюкина, а также в условиях фона и после инфузии полиглюкина сравнивались между собой с применением парного критерия Вилкоксона. Изменение ОП применения ПФ для оценки АД в сонных артериях после моделирования кровопотери и восстановления ОЦК, а также сравнение модулей ОП производилось с применением парного критерия Вилкоксона. Все значения представлены в виде μ ; (95%CI) и $\mu \pm \text{SD}$. Статистическая обработка выполнена с применением встроенных функций Excel из прикладного пакета программ Microsoft Office 2007, программ AtteStat, Past version 2.17; StatXact-8 с программной оболочкой Cytel Studio version 8.0.0.

Результаты и обсуждение

Анализ данных выявил статистически значимое снижение АД в сонных и бедренных артериях после моделирования кровопотери (рис. 1). После восстановления ОЦК имело место статистически значимое увеличение АД в сонных и бедренных артериях как по сравнению со значениями АД в условиях кровопотери, так и в условиях фона (рис. 1). Анализ изменений СРПВ выявил статистически значимое снижение СРПВ после моделирования кровопотери и увеличение СРПВ как

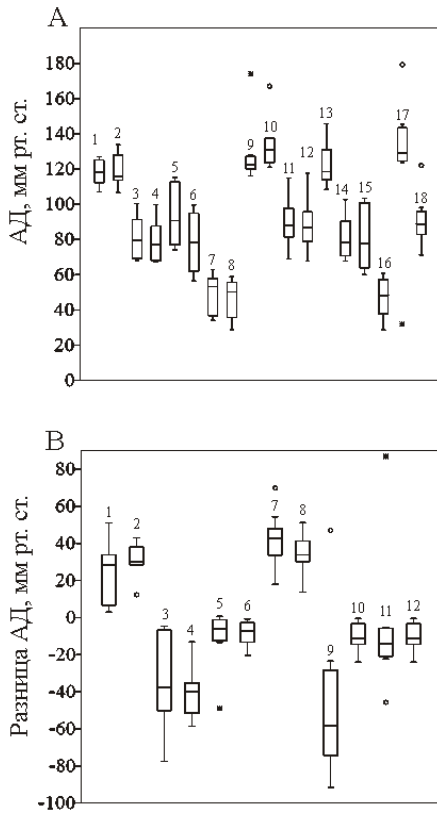


Рис. 1. Значения систолического и диастолического АД в сонных и бедренных артериях (А) полученные при прямом измерении и рассчитанные с применением ПФ в различных условиях. Средняя разница и сравнение значений систолического и диастолического АД, полученных в различных условиях экспериментов (В).

Условные обозначения: А: систолическое АД в сонных артериях, полученное при прямом измерении (1) и рассчитанное с применением ПФ (2) в условиях фона; диастолическое АД в сонных артериях, полученное при прямом измерении (3) и рассчитанные с применением ПФ (4) в условиях фона; систолическое АД при кровопотере, полученное прямым измерением (5) и рассчитанное с применением ПФ (6); диастолическое АД в сонных артериях, полученные при кровопотере прямым измерением (7) и с применением ПФ (8); систолическое АД в сонных артериях полученные при прямом измерении (9) и рассчитанное с применением ПФ (10) в условии восстановления ОЦК после кровопотери; диастолическое АД в сонных артериях, полученные при прямом измерении (11) и рассчитанное с применением ПФ (12); систолическое (13) и диастолическое (14) АД в бедренных артериях, измеренное в условии фона; систолическое (15) и диастолическое (16) АД в бедренных артериях, полученные в условиях кровопотери; систолическое (17) и диастолическое (18) АД в бедренных артериях, полученные при восстановлении ОЦК после кровопотери.

В: средняя разница значений систолического (1), $p = 0,00024$ и диастолического (2), $p = 0,00024$ АД в сонных артериях до и после моделирования кровопотери; разница значения систолического (3), $p = 0,00098$ и диастолического (4) $p = 0,00098$ АД в сонных артериях в условиях кровопотери и после восстановления ОЦК; разница значений систолического (5), $p = 0,00097$ и диастолического (6) $p = 0,000195$ АД в сонных артериях в условиях фона и после восстановления ОЦК; средняя разница значений систолического (7) $p = 0,00024$ и диастолического АД (8) $p = 0,00024$ в бедренной артерии до и после моделирования кровопотери; средняя разница значений систолического (9) $p = 0,00098$ и диастолического (10) $p = 0,00098$ АД в бедренной артерии после моделирования кровопотери и восстановления ОЦК; средняя разница систолического (11) $p = 0,00537$ и диастолического (12) $p = 0,00293$ АД в бедренных артериях.

после компенсации кровопотери за счет восстановления ОЦК, так и при сравнении значений СРПВ в условиях фона и после восстановления ОЦК (рис. 2).

Применение ПФ (рис. 3) для оценки АД в сонных артериях показало, что в условиях моделирования кровопотери ОП оценки АД с применением ПФ статистически значимо возростала (таблица). При компенсации кровопотери инфузией полиглобулина происходило статистически значимое уменьшение ОП (таблица). Сравнение ОП, полученных при применении ПФ в условии фона и после восстановления ОЦК инфузией полиглобулина не показало статистически значимых изменений (таблица).

В относительно стабильных условиях системы кровообращения погрешность применения ПФ для оценки АД в сонных артериях сравнима с технической погрешностью датчика ПДП-400 [10]. Известно, что изменения механических свойств сосудистого русла под влиянием различных факторов способно повлиять на применение обсуждаемых методик [11, 12].

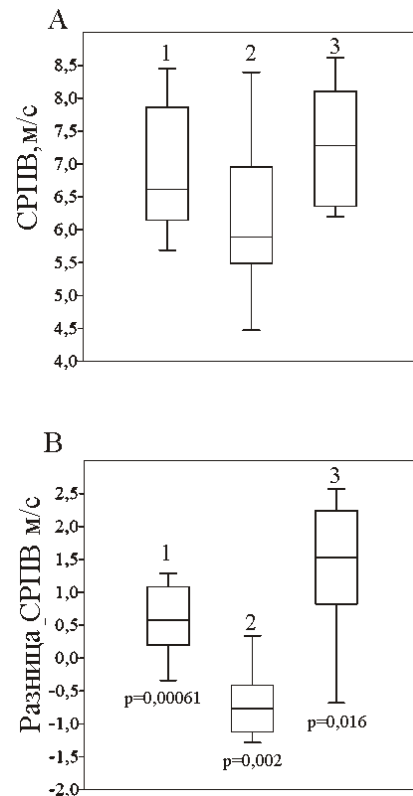


Рис. 2. Значения (А) СРПВ до и после моделирования кровопотери и восстановления ОЦК. Средняя разница и сравнение значений СРПВ (В), полученных при различных условиях.

Условные обозначения: А: значения СРПВ в условиях фона (1), моделирования кровопотери (2) и восстановление ОЦК (3). В: разница и сравнение значений СРПВ до и после кровопотери (1), после восстановления ОЦК (2) и сравнение СРПВ в условиях фона и при восстановления ОЦК после кровопотери.

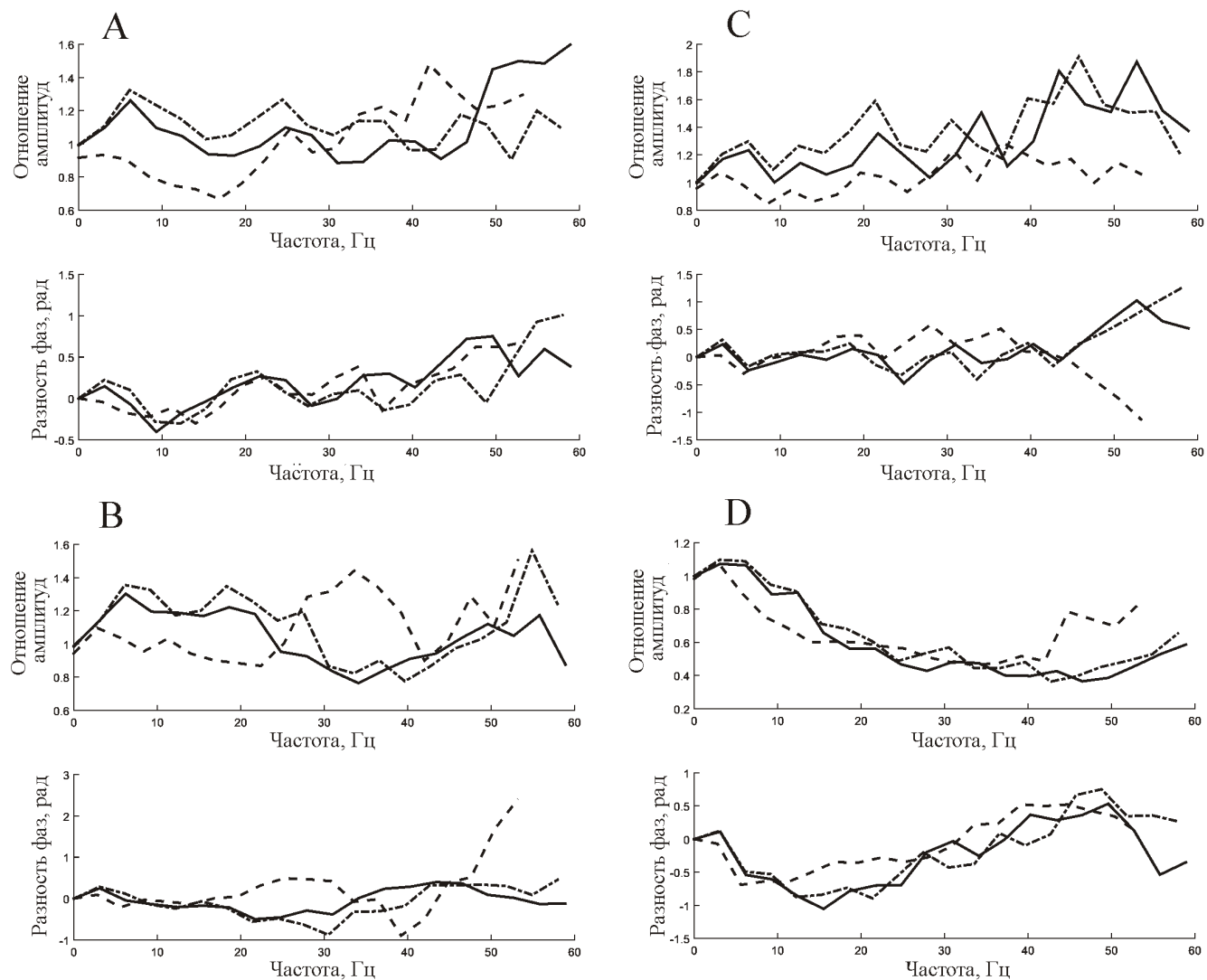


Рис. 3. Примеры передаточных функций, рассчитанных у четырех (А,В,С,Д) крыс. Условные обозначения: сплошная линия – ПФ, рассчитанная в условиях фона; пунктир – ПФ, рассчитанная в условии кровопотери; штриховый пунктир – ПФ, рассчитанная в условии компенсации ОЦК инфузией раствора полиглюкина.

Таблица

Относительная погрешность расчета системного АД с применением ПФ в различных условиях

Условие	ОП, %	
	Систолическое АД	Диастолическое АД
Фон	2,54 (1,47; 3,61)	1,58 (0,80; 2,36)
Кровопотеря	16,27 (12,45; 20,08)	5,97 (3,26; 8,67)
Восстановление ОЦК	6,41 (3,71; 9,10)	1,54 (1,10; 1,98)
Средняя разница значений ОП до и после кровопотери	-13,72 (-19,60; -8,02) p = 0,001953	-3,75 (-7,46; -1,88) p = 0,001953
Средняя разница значений ОП после восстановления ОЦК	9,07 (3,54; 14,33) p = 0,01563	4,36 (0,33; 10,88) p = 0,03125
Средняя разница значений ОП в состоянии фона и после восстановления ОЦК	7,76 (-0,99; 9,27) p = 0,08	-2,49 (-5,70; 0,97) p = 0,1563

Результаты данной работы показывают, что при снижении ОЦК значительное уменьшение (на $19,27 \pm 17,73\%$) СРПВ способствует возрастанию погрешности оценки АД в сонных артериях с применением ПФ. При восстановлении ОЦК инфузией полиглюкина увеличение СРПВ по сравнению с фоновыми условиями составляло $6,19 \pm 9,03\%$. По-видимому, эквивалентное данному изменению увеличение жесткости сосудов не способно повлиять на применение ПФ для оценки показателей системной гемодинамики. Полученные результаты свидетельствуют, что компенсация снижения ОЦК достаточна для восстановления условий, при которых погрешность расчета системного АД с применением ПФ становится сравнимой с погрешностью ее вычислений в условиях фона.

References

1. Kuz'kov V.V., Kirov M.Ju. *Invasive hemodynamic monitoring in the intensive care and anesthesiology: monograph. [Invazivniy monitoring gemodinamiki v intensivnoy terapii I anesteziologii: monografiya]* Second Edition, revised and additional: Arkhangelsk: Northern State Medical University; 2015. (in Russian)
2. Bein B., Meybohm P., Cavus E., Renner J., Tonner P.H., Steinfath M. et al. The reliability of pulse contour-derived cardiac output during hemorrhage and after vasopressor administration. *Anesth. Analg.* 2007; 115(1): 107-13.
3. Gruenewald M., Renner J., Meybohm P., Hocker J., Scholz J., Bein B. Reliability of continuous cardiac output measurement during intra-abdominal hypertension relies on repeated calibrations: an experimental animal study. *Crit Care.* 2008; 12(5): 132.
4. Balueva T.V., Verlov N.A., Yerkudov V.O., Landa S.B., Pugovkin A.P., Sergeev I.V. Estimation of the systemic cardiovascular parameters by means of monitoring of the peripheral arterial pressure. *Regionarnoe krovoobrashchenie I mikrotsirkulyatsiya.* 2011; 38 (2): 79-84. (in Russian)

mic cardiovascular parameters by means of monitoring of the peripheral arterial pressure. *Regionarnoe krovoobrashchenie I mikrotsirkulyatsiya.* 2011; 38 (2): 79-84. (in Russian)

5. Balueva T.V., Verlov N.A., Yerkudov V.O., Landa S.B., Pugovkin A.P., Sergeev I.V. et al. Estimation of the systemic cardiovascular parameters by means of monitoring the peripheral arterial pressure after administration of vasoactive substances. *Regionarnoe krovoobrashchenie I mikrotsirkulyatsiya.* 2012; 43(3): 57-63. (in Russian)

6. Pugovkin A.P., Verlov N.A., Yerkudov V.O., Landa S.B., Popov V.V., Priima N.F. et al. Non-invasive measurement of aortic blood pressure and flow in humans on the basis of monitoring the peripheral arterial pressure. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimentalnaya Terapiya.* 2012; 4: 75-9. (in Russian)

7. Balueva T.V., Verlov N.A., Yerkudov V.O., Landa S.B., Pugovkin A.P., Sergeev I.V. et al. Management of the systemic cardiovascular parameters by means of monitoring the peripheral arterial pressure after intravenous volume load and acute blood loss. *Regionarnoe krovoobrashchenie I mikrotsirkulyatsiya.* 2013; 46 (2): 74-82. (in Russian)

8. 2000 Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2001; 218 (5): 669-96.

9. Altman P.L., Dittmer D.S., Grebe R.M. *Handbook of circulation.* W.B. Saunders Company. Philadelphia and London, 1959.

10. Sergeev I.V., Osadchij L.I., Popov D.G. Elektromagnetometr based in Russia made of industrial pressure transmitter. *Fiziologicheskiy zhurnal SSSR.* 1983; 69(7): 966-8. (in Russian)

11. O'Rourke M.F., Pauca A., Jiang X.J. Pulse wave analysis. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2001; 51(6): 507-22.

12. Nelson M.R., Stepanek J., Cevette M., Covalciuc M., Hurst R.T., Tajik A.J. Noninvasive measurement of central vascular pressures with arterial tonometry: clinical revival of the pulse pressure waveform? *Mayo Clin. Proc.* 2010; 85 (5): 460-72.

Поступила 20.11.15

Сведения об авторах:

Пуговкин А.П., доктор биол. наук, проф. каф. нормальной физиологии ГБОУ ВПО СПбГПМУ Минздрава России, e-mail: apugovkin@mail.ru

Верлов Н.А., канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. медицинской биофизики ФГБУ «ПИЯФ», e-mail: virlov@gmail.com

Сергеев И.В., науч. сотр. лаб. физиологии сердечно-сосудистой и лимфатической систем «Института физиологии им. И.П. Павлова» РАН, e-mail: shus@kolt.infran.ru

Иевков С.А., врач анестезиолог-реаниматолог СПб ГБУЗ «Детская городская больница № 1», e-mail: oduvancha@gmail.com

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616-092

Панченко Л.Ф.^{1,2}, Баронец В.Ю.¹, Наумова Т.А.¹,
Пирожков С.В.³, Теребилина Н.Н.¹, Шойбонов Б.Б.⁴

Роль липопротеин-ассоциированного фермента параоксаназы-1 и его полиморфизмов в патогенезе эндотелиальной дисфункции и развитии соматических осложнений у больных алкоголизмом

¹ — НИИН филиал ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России, Москва

² — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Россия, Москва

³ — ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва

⁴ — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина», Россия, Москва

Приведен обзор современных данных о роли многофункционального фермента, ассоциированного с липопротеинами высокой плотности — параоксаназы 1 (PON1) в поддержании нормальной эндотелиальной функции путем детоксификации окисленных липопротеинов низкой плотности и тиолактона гомоцистеина. Дополнительный вклад в защиту эндотелия от повреждения вносит органопфосфатазная активность PON1, участвующая в детоксификации табачного дыма. Нарушение антиокислительной активности PON1 способствует дифференцировке моноцитов в макрофаги с последующим развитием воспалительной реакции стенки сосудов. Снижение тиолактоназной активности PON1 сопровождается дефицитом ресинтеза метионина из гомоцистеина, что приводит к гипометилированию ДНК и к сдвигам экспрессии про- и анти-атерогенных генов. Глобальное гипометилирование генома рассматривается как один из трех важнейших механизмов повышенного риска соматических осложнений алкоголизма. Кроме того накопление тиолактона гомоцистеина, проявляющего свойства агониста глутаматергических рецепторов и антагониста дофаминергических рецепторов, служит предпосылкой усиления симптомов алкогольной зависимости. Обзор клинических наблюдений, сфокусированных на генных полиморфизмах PON1, свидетельствует о неодинаковой степени атеропротекторных свойств для трех различных генотипов полиморфизма PON1Q192R.

Ключевые слова: параоксаназа 1; полиморфизм PON1Q192R; окисленные липопротеины низкой плотности; тиолактон гомоцистеина; гипометилирование ДНК; эндотелиальная дисфункция; алкогольная зависимость

Для цитирования: Панченко Л.Ф., Баронец В.Ю., Наумова Т.А., Пирожков С.В., Теребилина Н.Н., Шойбонов Б.Б. Роль липопротеин-ассоциированного фермента параоксаназы-1 и его полиморфизмов в патогенезе эндотелиальной дисфункции и развитии соматических осложнений у больных алкоголизмом. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016; 60(1): 50—58.

Работа выполнена при поддержке гранта РГНФ 13-06-00279

Panchenko L.F.^{1,2}, Baronets V.Yu.¹, Naumova T.A.¹,
Pyrozkhov S.V.³, Terebilina N.N.¹, Shoibonov B.B.⁴

The role of lipoprotein-associated enzyme paraoxonase 1 and its polymorphisms in the pathogenesis of endothelial dysfunction and somatic complications in patients with alcoholism: Review

¹ — Federal State Budgetary Institution «V.Serbysky Federal Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 119991, Moscow, Kropotkinsky per., 23

² — Federal State Budgetary Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS», 125315, Moscow, the Baltijskaja str., 8

³ — The State Education Institution of Higher Professional Training «The First Sechenov Moscow State Medical University» under Ministry of Health of the Russian Federation, 119991, Moscow, Trubetskaya str., 8, p. 2

⁴ — Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Peoples' Friendship University of Russia», 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 6

Для корреспонденции: Наумова Татьяна Александровна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. Биохимии,
e-mail: naumova-414@mail.ru

A review of recent data on the role of the multifunctional enzyme, associated with high density lipoproteins — paraoxonase 1 (PON1) in maintaining healthy endothelial function by detoxifying both oxidized low density lipoproteins and homocysteine thiolactone. The additional contribution to the protection of the endothelium against damage makes organophosphatase activity of PON1 involved in the detoxification products of tobacco smoke. The reduction of antioxidant activity of PON1 promotes the differentiation of monocytes into macrophages and the development of inflammation. The reduction of thiolactonase activity of PON1 is accompanied by a decrease of methionine re-synthesis from homocysteine causing DNA-hypomethylation and alteration of the expression patterns of pro- and anti-atherogenic genes. Global hypomethylation of the genome is regarded as one of the three most important mechanisms of the increased risk of somatic complications of alcoholism. The accumulation of homocysteine thiolactone serving agonist of glutamate receptors and antagonist of dopamine receptors is a prerequisite to increased alcohol abuse. Clinical observations focusing on gene polymorphisms of PON indicate that three different genotypes of polymorphism PON1Q192R have unequal degrees atheroprotective properties.

Keywords: *paraoxonase-1; PON1Q192R polymorphism; oxidized low density lipoproteins; homocysteine thiolactone; DNA hypomethylation; endothelial dysfunction; alcohol addiction*

For citation: *Panchenko L.F., Baronets V.Yu., Naumova T., Pyrozhekov S.V., Terebilina N.N., Shoibonov B.B. The role of lipoprotein-associated enzyme paraoxonase 1 and its polymorphisms in the pathogenesis of endothelial dysfunction and somatic complications in patients with alcoholism. Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya. 2016; 60(1): 50–58. (in Russian)*

For correspondence: *Naumova T.A., e-mail: naumova-414@mail.ru*

Funding. *The study was supported by Grant of the Russian Science Foundation 13-06-00279.*

В основе широкого спектра патологических состояний, сопровождающих хроническое злоупотребление алкоголем, включая гиперхолестеринемию, гипертензию, атеросклероз, заболевания коронарных артерий, легких, цирроз печени, дисфункцию мозга, лежит эндотелиальная дисфункция [1–3]. Эндотелий включает в себя более 10^{13} эндотелиальных клеток, локализованных во всех тканях организма и генерирующих необходимые для поддержания сосудистого гомеостаза органов вазодилататоры и вазоконстрикторы. Нормально функционирующий эндотелий обеспечивает строго необходимую степень проницаемости сосудистой стенки, предупреждает адгезию и агрегацию тромбоцитов, препятствуя тромбозам, ингибирует избыточную пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов, ограничивает адгезию лейкоцитов, предотвращая их инфильтрацию и развитие воспаления. Эндотелиальная дисфункция — один из наиболее ранних маркеров сосудистой патологии. Хотя эндотелиальная дисфункция имеет мультифакториальную природу, одним из ключевых ее механизмов признается нарушение синтеза или биодоступности оксида азота, поскольку именно оксид азота опосредует многие из вышеперечисленных функций здорового эндотелия.

Высказывались предположения о том, что решающую роль в снижении NO-зависимой дилатации сосудов играет окислительный стресс, приводящий к образованию пероксинитрита из оксида азота. Однако эти предположения не подтвердились, поскольку было обнаружено значительное расхождение по времени процессов синтеза оксида азота в макрофагах и эндотелиальных клетках и активации НАДФН-оксидазного пути — главного источника активных

форм кислорода. Кроме того, не удалось выявить положительных эффектов антиоксидантной терапии для предотвращения нарушений NO-зависимой эндотелиальной дилатации [4].

Другой причиной дефицита оксида азота при эндотелиальной дисфункции называлась активация аргиназы, фермента, конкурирующего с синтазой оксида азота (NOS) за общий субстрат — аргинин [5]. Активность аргиназы достоверно повышается в сыворотке и в эндотелиальных клетках больных с сердечной недостаточностью. Однако доля аргинина, расходуемого на синтез оксида азота, в сотни раз меньше концентрации аргинина в эндотелиальных клетках, в связи с чем, дефицит субстрата вряд ли является основной причиной нарушения продукции оксида азота и, вероятнее всего, существуют дополнительные механизмы NO-зависимой дисфункции эндотелия.

В этом отношении привлекает внимание способность липопротеинов высокой плотности (ЛВП), взятых от здоровых людей, стимулировать синтез оксида азота в эндотелиальных клетках [6]. В то же время ЛВП, выделенные у больных с заболеваниями коронарных артерий, не только не активировали, но даже ингибировали активность эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), не влияя при этом на продукцию супероксида и активность НАДФН-оксидазы. Стимуляция продукции оксида азота, вызываемая ЛВП здоровых людей, коррелировала с блокирующим эффектом ЛВП на экспрессию молекул эндотелиально-моноцитарной адгезии, с обратным транспортом холестерина из макрофагов и с активностью фермента, входящего в структуру частиц ЛВП — параоксаназы-1 (PON-1). PON-1 (EC 3.1.8.1) — многофункциональный фермент, имеющий несколько

каталитических центров, способных гидролизировать различные субстраты [7]. Первыми из обнаруженных субстратов PON1 были орнанофосфатные яды, один из которых — параоксон — и дал название этому ферменту. Позднее были обнаружены арилэстеразная и пероксидазная активности PON1, участвующие в гидролизе перекисей липидов и окисленных ЛНП и определяющие антиоксидантную роль PON1. Однако, судя по кинетическим параметрам PON1 с различными субстратами, наиболее вероятными физиологическими субстратами фермента являются лактоны, прежде всего тиолактон гомоцистеина, гидролизуемые лактоназным каталитическим центром.

Роль лактоназной активности PON1 в эндотелиальной дисфункции

Гомоцистеин (ГЦ) образуется в организме в ходе деметилирования метионина. Метионин в результате взаимодействия с АТФ вначале превращается в SAM (S-аденозил-метионин) — биологический донор метильных групп, а затем деметилирование SAM приводит к образованию ГЦ, который при участии витаминов B12 и фолиевой кислоты может превращаться обратно в метионин, а при участии витамина B6 превращается в цистеин (рис.1).

Однако ГЦ может также метаболизироваться метионил-РНК-синтазой в тиолактон ГЦ, являющийся субстратом PON1. При недостаточной активности PON1, приводящей к блокаде обратного превращения тиолактона в свободный ГЦ, происходит выведение ГЦ из рециклинга метионина. Тем самым созда-

ется дефицит метильных групп, необходимых для реакций метилирования ДНК и белков, в том числе гистоновых.

Метилирование ДНК и гистонов является важным фактором контролирования генной экспрессии. При этом для одних генов метилирование ДНК в промотерных участках сопряжено с блокадой их экспрессии — «молчанием» гена, а гипометилирование, вызванное дефицитом метильных групп, активирует эти в норме «молчащие» гены. К их числу относятся многие гены, ассоциированные с биологическими процессами, лежащими в основе сердечно-сосудистых заболеваний: гены VCAM-1 (молекулы адгезии сосудистых клеток) и ICAM-1 (молекулы межклеточной адгезии), опосредующие миграцию воспалительных клеток из крови во внесосудистое пространство [8, 9, 10], гены воспалительных медиаторов в лейкоцитах [10, 11, 12], гены рецепторов бесконтрольного поступления в макрофаги и эндотелиальные клетки окисленных ЛНП, связанных с атерогенезом стенок аорты [10, 13], гены матриксных металлопротеиназ MMP-1 и MMP-8, определяющих фибротические изменения сосудов [10], ген индуцибельной NOS, также задействованной в повреждении сосудов [14]. С другой стороны, активация гена эндотелиальной NOS, главного защитного фактора эндотелия, требует предварительного метилирования промотерного участка гена, поэтому гипометилирование приводит к супрессии eNOS [6, 9, 15]. Дефицит метильных групп репрессирует также ген FOXP3 — фактора транскрипции, специфичного для популяции T-регуляторных лимфоцитов, отвечающих за лимитирование избыточных воспалительных реакций [16, 17]. Именно воспалительные реакции являются основным механизмом повреждения сосудистой стенки на всех стадиях атеросклероза. Глобальное гипометилирование ДНК может также индуцировать хромосомную нестабильность, приводя к повышенной частоте мутаций.

Аберрантное метилирование ДНК, отмечаемое при сосудистых заболеваниях, коррелирует с гипергомоцистеинемией [11, 15, 18, 19]. Отмечено, что повышение уровня ГЦ и его метаболитов в плазме на каждые 12% относительно нормы, увеличивает риск инфаркта миокарда в 3—4 раза. При этом сравнительный анализ проатерогенных изменений генной экспрессии в сосудистых эндотелиальных клетках человека, индуцируемых различными метаболитами ГЦ, продемонстрировал, что ГЦ-тиолактон модифицирует экспрессию значительно большего количества генов (113 генов) в сравнении с гомоцистеинизированным белком, синтез которого тоже требует предварительного образования тиолактона (47 генов), и ГЦ (30 генов) [10]. Поэтому гидролиз тиолактона гомо-

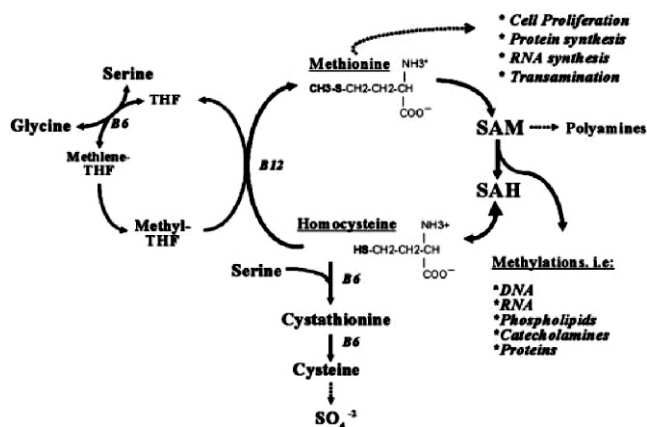


Рис. 1. Пути превращения метионина в гомоцистеин и ресинтеза метионина из гомоцистеина. Сокращения: SAM — S-аденозилметионин, SAH — S-аденозилгомоцистеин, THF — тетрагидрофолат, 5-CH3-THF — метилтетрагидрофолат, Метилен-THF — метилентетрагидрофолат; MTHFR — метилентетрагидрофолатредуктаза (репродукция из статьи Troen A.M. et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2003; 100(25): 15089-94 [8]).

цистеина при участии PON1 рассматривается как важный механизм защиты от заболеваний коронарных, церебральных и периферических сосудов [20]. Важное место среди факторов, приводящих к гипергомоцистеинемии, занимает хроническое злоупотребление алкоголем [21—24], а глобальное гипометилирование генома входит в первую тройку механизмов повышенного риска соматических осложнений алкоголизма [25, 26] и, кроме того, рассматривается как потенциальный фактор риска алкогольной зависимости, опосредующий эпигенетическую трансформацию глутаматергической нейромедиации [27].

Кроме метилирования ДНК, тиолактон ГЦ ингибирует метилирование белков по аргининовым остаткам, которое опосредует посттрансляционное регулирование активности ферментов [28]. Показано, что гипометилирование аргининовых остатков белков в эндотелиальных клетках приводит к их преждевременному старению и ускоренному апоптозу [29].

Еще один механизм биотоксичности тиолактона ГЦ заключается в индуцируемой им модификации белковой структуры посредством присоединения гомоцистеина к лизинным остаткам белков. «Гомоцистеинизация» вызывает нарушение функции белков или образование токсических, так называемых амилоидоподобных структур. Такие структуры обнаруживаются при атеросклерозе и при болезни Альцгеймера [30]. Примечательно, что хотя тиолактон ГЦ может обнаруживаться в самых различных тканях, тем не менее, PON1 вносит более значительный вклад в метаболизм ГЦ-тиолактона в мозге.

Гомоцистеинизация белков является одним из механизмов снижения активности антиоксидантных ферментов: глутатион-пероксидазы, тиоредоксина и супероксиддисмутазы — и инициации, тем самым, окислительного стресса, показателем чего служит повышенный уровень малонового диальдегида — конечного продукта перекисного окисления липидов у больных с гипергомоцистеинемией, а также окисление незаменимого кофактора NO-синтазы — тетрагидробиоптерина, который поддерживает димерную структуру фермента, необходимую для продукции оксида азота [31]. Дефицит тетрагидробиоптерина способен не просто снижать продукцию оксида азота NO-синтазой, а целиком переключать фермент на продукцию супероксида. Молекула NOS представляет собой в норме димер, состоящий из двух одинаковых мономеров, расположенных таким образом, что НАДФН-редуктазный домен одного мономера локализуется рядом с оксигеназным доменом второго мономера, в результате чего, электроны, освобождающиеся при окислении НАДФН, идут на окисление гуанидиновой группы аргинина, что и приводит к образованию оксида азота. При расщеплении NOS на

отдельные мономеры, в условиях дефицита тетрагидробиоптерина, электроны, освобождающиеся при окислении НАДФН, идут на продукцию супероксида из молекулярного кислорода. Существует предположение, что в большом количестве случаев хронического окислительного стресса основной вклад в продукцию активных форм кислорода вносит не столько активация НАДФН-оксидазы, которая обычно имеет непродолжительный характер, сколько «расщепленная» NO-синтаза. Например, в ответ на инкубацию макрофагов с эндотоксином активность НАДФН-оксидазы достигает максимума в первые минуты после стимуляции, но уже меньше, чем через час, возвращается к обычному низкому уровню. При этом активацию NOS впервые фиксируют через 5 часов, а после 15 часов инкубации с эндотоксином она целиком обеспечивает всю продукцию супероксида макрофагами [32].

Показано, что гомоцистеинизации часто подвергаются также апопротеины, входящие в состав ЛНП [33]. Это индуцирует агрегацию ЛНП и неограниченный захват агрегированных ЛНП макрофагами с превращением последних в «пенистые» клетки [34],

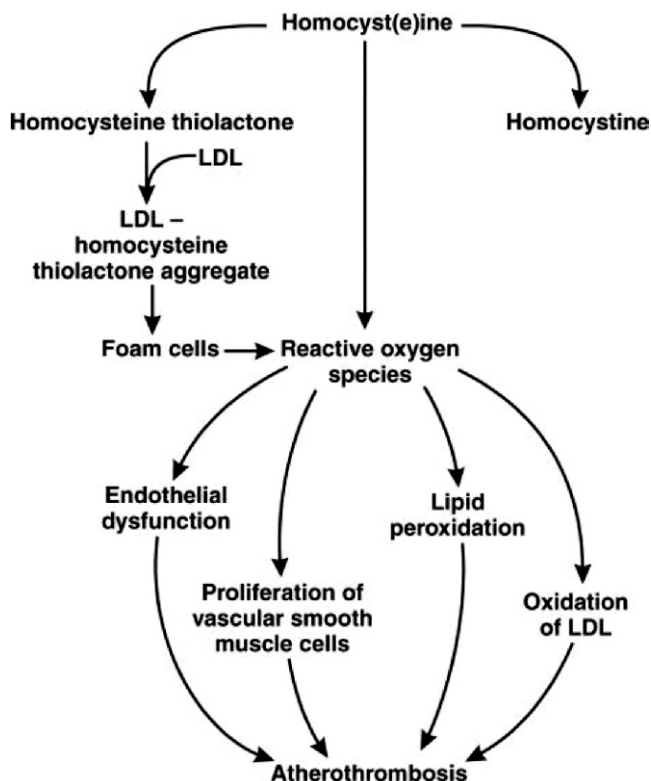


Рис. 2. Схема совместного участия тиолактона гомоцистеина и окисленных ЛНП в атерогенезе и атеротромбозе. Сокращения: LDL — липопротеины низкой плотности (репродукция из статьи Marcus J. et al. Can J Cardiol. 2007; 23(9):707-10 [34]).

служащие индукторами дальнейшего усиления окислительного стресса, эндотелиальной дисфункции и атеротромбоза (рис. 2).

Присоединяясь к лизинovým группам белков организма, тиолактон ГЦ меняет их структуру таким образом, что собственные белки начинают восприниматься иммунокомпетентными клетками как чужеродные, запуская аутоиммунные воспалительные реакции [35].

Повышение уровня ГЦ и его наиболее реакционно-способного метаболита — тиолактона, иммунная активация и окислительный стресс образуют в организме своего рода «порочный круг», наиболее уязвимым звеном которого является активность PON1 (рис. 3).

Решающая роль нарушения активности PON1 в патогенезе заболеваний, связанных с сосудистой патологией, была подтверждена в опубликованном в 2012 г. метаанализе 47 работ, в которых были обследованы 9853 больных с заболеваниями коронарных артерий и 11 408 здоровых лиц, и установлена корреляционная связь между низкой тиолактоназой активностью сывороточной PON1 и высоким риском атеросклероза [36].

Антиатерогенные эффекты PON1, связанные с ее арилэстеразной и пероксидазной активностью

Наряду с дефицитом оксида азота, вторым важнейшим индуктором эндотелиальной дисфункции считают окисленные ЛНП (окЛНП). Они служат хемоаттрактантами для макрофагов, активно захватывающих их своими ловушечными (скевенджер)-рецепторами, вызывая резкое усиление воспалительной реакции. окЛНП нарушают популяционный баланс лимфоцитов, увеличивая частоту провоспалительных популяций (особенно наиболее патогенных из них —

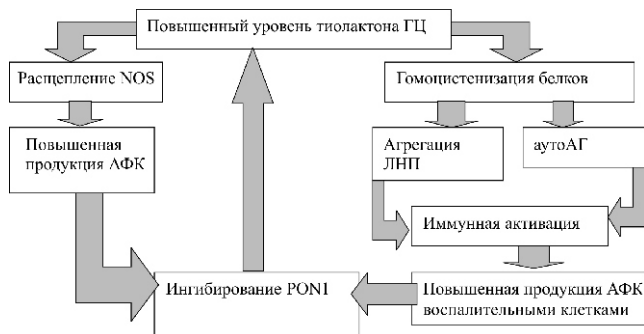


Рис. 3. Взаимная стимуляция повышенного уровня тиолактона гомоцистеина, окислительного стресса и иммунной активации. Сокращения: ГЦ — гомоцистеин, NOS — синтаза оксида азота, АФК — активные формы кислорода, ЛНП — липопротеины низкой плотности, аутоАГ — (ауто-антигены).

Тх17-клеток) и уменьшая частоту Т-регуляторных лимфоцитов, ограничивающих воспаление, угнетают синтез NO тромбоцитами, стимулируя их агрегацию, повышают патологическую экспрессию коллагена эндотелиальными клетками аорты человека [37]. Скевенджер-рецепторы окЛНП имеются и на эндотелиальных клетках: кратковременная экспозиция эндотелиальных клеток с окЛНП запускает их аутофагию, а долговременная — апоптоз.

Помимо прямых токсических эффектов окЛНП на эндотелий и макрофаги, высокий риск сердечно-сосудистых заболеваний, связанный с окЛНП, может опосредоваться модификацией гистонов ацетильными группами этих липопротеинов, например, гистонов, регулирующих экспрессию генов ICAM1- молекулы межклеточной адгезии и антивоспалительного и анти-тромботического белка — тромбомодулина, что приводит к образованию пластинчатого тромба [12].

Известно, что с ЛВП ассоциирован целый ряд белков, обладающих антиоксидантными свойствами, таких, как Apo A1, лецитин:холестерин-ацилтрансфераза, ацетилтрансфераза тромбоцит-активирующего фактора, однако PON1 является доминирующим антиоксидантным ферментом. Инкубация очищенной PON1 с окЛНП приводит к их разрушению. Кроме того, очищенная PON1 способна предотвращать окисление ЛНП [9, 38]. Мыши с выключенным геном PON1 («нокаутированной» PON1) проявляют повышенную чувствительность к атеросклерозу, а ЛВП, полученные от таких мышей, в лучшем случае не оказывают эффекта на окисление ЛНП, а в худшем — даже усиливают его [38, 39]. И наоборот, ЛВП, взятые от мышей с повышенной экспрессией PON1, полностью блокируют окисление ЛНП [40]. Предполагают, что именно PON1 опосредует антиоксидантную активность некоторых природных антиоксидантов, например флавоноидов. Концентрация флавоноидов в организме слишком низка для выполнения ими достаточно эффективной антиоксидантной функции, но зато они способны поддерживать третичную структуру PON1, защищая фермент от ингибирования [41].

Нейропатологические эффекты нарушения активности PON1

Работы на мышах с «нокаутированной» PON1 продемонстрировали, что PON1 регулирует большое количество белков, вовлеченных в нарушения специфических функций мозга (обучения, пластичности), его антиоксидантной защиты, а также связанных с нейродегенеративными заболеваниями, такими, как болезнь Альцгеймера [42—44].

Нарушения метилирования, обусловленные недостаточной способностью PON1 гидролизовать тиолактон ГЦ, который блокирует ресинтез главного донора метильных групп (SAM), коррелируют с галлюцинаторными и депрессивными симптомами у больных шизофренией и одновременно с нарушениями иммунной системы [45—47]. А гомоцистеинизация ГЦ-тиолактоном гистоновых белков создает условия для нарушения репарации ДНК, что в совокупности со снижением ресинтеза метионина и, как следствие этого, дефицитом поставляемых метионином метильных групп для ДНК, может вызывать гибель нейронов (рис. 4).

Обнаружено, что даже незначительное снижение уровня метилирования ДНК (не более 10%), связанное с блокадой рециклинга метионина из тиолактона ГЦ, коррелирует с выраженной депрессивной симптоматикой [48].

Индуктируемое инактивацией PON1 накопление в мозге тиолактона ГЦ считается одним из механизмов гиперстимуляции NMDA-рецепторов, связанной с рядом психических симптомов, в частности с абстинентными алкогольными судорогами [24, 43, 49, 50]. Полагают, что тиолактон ГЦ служит альтернативным агонистом NMDA-рецепторов, однако в период алкогольной интоксикации NMDA-рецепторы заблокированы этанолом, в период же абстиненции этанольная блокада снимается и тиолактон вызывает их гиперстимуляцию.

Кроме того, ГЦ-тиолактон проявляет свойства антагониста дофаминергических нейронов, способствуя тем самым дефициту функции «системы награды» в головном мозге. Данная система имеет отношение к развитию алкогольной и наркотической аддикции [24]. Предполагается также еще один механизм блокирования дофаминовой системы при инактивации PON1. Индуцируемый ингибированием PON1 окислительный стресс приводит к дефициту тетрагидробиоптерина, что, как уже упоминалось выше, блокирует NO-синтезирующую активность. Однако тетрагидробиоптерин является также кофактором ферментов, синтезирующих моноаминные нейромедиаторы: дофамин, адреналин и норадреналин, в результате чего дефицит тетрагидробиоптерина приводит к дефициту моноаминной трансмиссии [51].

Роль полиморфизмов PON1 в атерогенных и нейропатологических эффектах

Как атерогенные, так и нейропатологические эффекты могут определяться не только снижением активности PON1, но и принадлежностью фермента к определенным типам генетических полиморфизмов. Известно более 200 однонуклеотидных полиморфиз-

мов PON1, из которых наиболее распространены полиморфизм в положении 192 (PONQ192R) с заменой глутамина на аргинин и в положении 55 (PONL55M) с заменой аминокислоты лейцин на метионин. Указанные полиморфизмы, в особенности полиморфизм PONQ192R, вносят вклад в межвидовую вариабельность степени риска заболевания, связанных с эндотелиальной дисфункцией.

Обозначения аллелей полиморфизма PONQ192R: Q и R — даны по первым буквам слов «Quiet» — спокойный, слабо реагирующий и «Reactive» — активный, характеризующих различную реакцию параоксоназной активности данных аллелей на солевую стимуляцию. Различия в солевой стимуляции легли в основу наиболее распространенного до последнего времени лабораторного способа генотипирования по данному полиморфизму. Более поздние исследования с применением методов ПЦР подтвердили, что Q-аллель соответствует глутамину, а R-аллель — аргинину. Генотипы QQ, QR и RR различаются не только по степени солевой стимуляции, но и по активности различных каталитических центров [52, 53]. Генотип QQ обладает сравнительно низкой способностью гидролизовать параоксон, но высокой антиоксидантной активностью, тогда как генотип RR, напротив, характеризуется максимальной из трех генотипов параоксоназной активностью и минимальной антиоксидантной. Генотип QR занимает промежуточное положение по активности обоих каталитических центров. Спорным и наименее изученным остается вопрос о соотношенности активности тиолактоназного центра с различными генотипами PONQ192R. По одним данным [52, 53], лица с QQ-генотипом характеризуются достоверно более высокой тиолактоназой активностью, чем носители RR-генотипа, тогда как в других работах [54, 55] средняя лактоназная активность RR-генотипа превышала таковую QQ-генотипа.

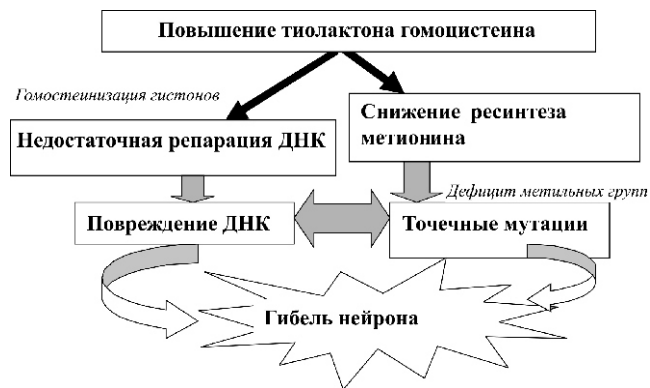


Рис. 4. Роль тиолактона гомоцистеина в повреждении ДНК и обусловленной этим гибели нейронов.

Исследования частотного распределения генотипов QQ-, QR- и RR- в различных популяциях людей выявили достоверную межэтническую вариабельность и вариабельность в отношении предрасположенности к тем или иным заболеваниям. R-аллель более часто встречается у афроамериканцев, а также у жителей Южной, Центральной и Западной Африки, тогда как у европейцев и белых американцев более частым является Q-аллель. Мексиканцы, перуанцы, жители Мозамбика и Эфиопии имеют почти равную частоту Q- и R-аллелей. В большинстве азиатских популяций (японцы, корейцы и китайцы) также отмечена высокая частота R-аллеля [56, 57, 58].

В исследовании Колесниковой Л.И. с соавт. [59], проведенном на территории России в Восточной Сибири, выявлена повышенная частота R-аллеля у бурятской популяции в сравнении с русской популяцией (частотное распределение QQ /QR/RR генотипов в русской популяции составило 35,4% / 56,9% / 7,7%, в бурятской популяции — 20,4% / 62,9% / 16,7%).

Подтверждена также связь между генетическими вариантами полиморфизма PONQ192R и чувствительностью к заболеваниям, в основе которых лежат нарушения антиоксидантного статуса, повышенное окисление ЛНП и гипергомоцистеинемия. Несмотря на то, что результаты, приводимые разными авторами, характеризуются определенной противоречивостью, в большинстве исследований отмечаются протекторные свойства для QQ-генотипа и провоцирующие для RR-генотипа в отношении риска сердечно-сосудистых заболеваний, метаболического синдрома, хронического воспаления [38, 47, 55, 60—64]. В меньшем числе работ обнаружены противоположные эффекты, а именно: защитная роль R-аллеля в снижении риска сосудистых заболеваний [53, 57]. Предполагают, что в последних случаях сказывается влияние специфического генетического фона, то есть наличие перестроек в других генах, способных модифицировать работу PON1, или влияние дополнительных факторов риска эндотелиальной дисфункции.

В частности, в некоторых работах отмечено, что хотя генотип QQ защищает от сосудистой дисфункции и метаболического синдрома, носители этого генотипа обладают повышенным риском развития указанных патологий при условии курения [47]. По всей вероятности, это связано с тем, что органофосфатазный каталитический центр PON1 участвует в детоксикации табачного дыма, а активность этого центра у QQ-генотипа минимальна в сравнении с двумя другими генотипами полиморфизма PONQ192R.

Несмотря на вовлеченность PON1 в метаболизм двух важнейших факторов риска сердечно-сосудистых осложнений алкоголизма, — окисленных ЛНП

и гомоцистеина, — повышение которых у больных алкоголизмом затрагивает многие органы и ткани, в том числе отделы мозга, что дает основания предполагать их вклад и в нервно-психическую составляющую алкогольной болезни, исследования ассоциации этого фермента с алкогольной зависимостью остаются немногочисленными и касаются в основном влияния на активность PON1 умеренного потребления алкоголя. В работах, посвященных изучению активности PON1 у больных алкоголизмом [65, 66], отсутствуют данные о частотном распределении генетических вариантов PON1, без чего трудно оценить степень отклонения активности данного фермента от нормы, различающейся для разных генотипов полиморфизма PONQ192R в 5—9 раз.

Таким образом, накопленные в настоящее время данные говорят об актуальности исследования активности и генетических вариантов PON1 для раннего выявления прогностических маркеров эндотелиальной дисфункции у больных алкоголизмом, для определения наиболее вероятных групп риска и разработки патогенетически обоснованной терапевтической коррекции.

References

1. Bonetti P.O., Lerman L.O., Lerman A. Endothelial dysfunction as marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23 (2): 168-75.
2. Vairappan B. Endothelial dysfunction in cirrhosis: Role of inflammation and oxidative stress. *World J. Hepatol.* 2015; 7 (3): 443-59.
3. van Sloten T.T., Schram M.T., Adriaanse M.C., Dekker J.M., Nijpels G., Teerlink T. et al. Endothelial dysfunction is associated with a greater depressive symptom score in a general elderly population: the Hoorn Study. *Psychol. Med.* 2014; 44 (7): 1403-16.
4. Maxwell S., Greig L. Anti-oxidants — a protective role in cardiovascular disease? *Expert. Opin. Pharmacother.* 2001; 2 (11): 1737-50.
5. Pernow J., Jung C. Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: reversal of arginine steal? *Cardiovasc. Res.* 2013; 98 (3): 334-43.
6. Besler C., Heinrich K., Rohrer L., Doerries C., Riwan-to M., Shih D.M. et al. Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating pathways in patients with coronary artery disease. *J. Clin. Invest.* 2011; 121 (7): 2693-708.
7. Draganov D.I., La Du B.N. Pharmacogenetics of paraoxanases, a brief review. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2004; 369: 78-88.
8. Troen A.M., Lutgens E., Smith D.E., Rosenberg I.H., Selhub J. The atherogenic effect of excess methionine intake. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(25): 15089-94.
9. Eren E., Ellidag H.Y., Aydin O., Yilmaz N. Homocysteine, Paraoxonase-1 and Vascular Endothelial Dysfunction: Omnibus viis Romam Pervenitur. *J. Clin. Diagn. Res.* 2014; 8 (9): CE01-4.
10. Gurda D., Handschuh L., Kotkowiak W., Jakubowski H. Homocysteine thiolactone and N-homocysteinylated protein induce pro-atherogenic changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Amino Acids.* 2015; 47(7): 1319-39.

11. Baccarelli A., Wright R., Bollati V., Litonjua A., Zanobetti A., Tarantini L. et al. Ischemic heart disease and stroke in relation to blood DNA methylation. *Epidemiology*. 2010; 21(6): 819-28.
12. Kim Y.R., Kim C.S.I, Naqvi A., Kumar A., Kumar S., Hoffman T.A., Irani K. Epigenetic upregulation of p66shc mediates low-density lipoprotein cholesterol-induced endothelial cell dysfunction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2012; 303 (2): H189-96.
13. Yang X.L., Tian J., Liang Y., Ma C.J., Yang A.N., Wang J. et al. Homocysteine induces blood vessel global hypomethylation mediated by LOX-1. *Genet. Mol. Res.* 2014; 13 (2): 3787-99.
14. Chan G.C., Fish J.E., Mawji I.A., Leung D.D., Rachtlis A.C., Marsden P.A. Epigenetic basis for the transcriptional hyporesponsiveness of the human inducible nitric oxide synthase gene in vascular endothelial cells. *J. Immunol.* 2005; 175 (6): 3846-61.
15. Zhang J.G., Liu J.X., Li Z.H., Wang L.Z., Jiang Y.D., Wang S.R. Dysfunction of endothelial NO system originated from homocysteine-induced aberrant methylation pattern in promoter region of DDAH2 gene. *Chin. Med. J. (Engl)*. 2007; 120 (23): 2132-37.
16. Lu C.X., Xu R.D., Cao M., Wang G., Yan F.Q., Shang S.S. et al. FOXP3 demethylation as a means of identifying quantitative defects in regulatory T cells in acute coronary syndrome. *Atherosclerosis*. 2013; 229 (1): 263-70.
17. Wang L., Liu Y., Beier U.H., Han R., Bhatti T.R., Akimova T., Hancock W.W. et al. Foxp3⁺ T-regulatory cells require DNA methyltransferase 1 expression to prevent development of lethal autoimmunity. *Blood*. 2013; 121 (18): 3631-9.
18. Kubatiev A.A., Alexandrov V.V., Ivanov A.V., Luziannin B.P. The influence of hyperhomocysteinemia on cerebral blood flow according wavelet analysis. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2011; (2): 13-8. (in Russian)
19. Kubatiev A.A., Tomilova E.N., Abramova E.A., Potemkin V.V., Trinity S.Y. The role of hyperhomocysteinemia in the pathogenesis of vascular complications of type 2 diabetes. *Rossiyskiy medicinskiy zhurnal*. 2007; (3): 53-5. (in Russian)
20. Domagaka T.B., Kacinski M., Trzeciak W.H., Mackness B., Mackness M.I., Jakubowski H. The correlation of homocysteine-thiolactonase activity of the paraoxonase (PON1): protein with coronary heart disease status. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 2006; 52 (5): 4-10.
21. Bleich S., Bleich K., Kropp S., Bittermann H.J., Degner D., Sperling W. et al. Moderate alcohol consumption in social drinkers raises plasma homocysteine levels: a contradiction to the 'French Paradox'? *Alcohol Alcohol*. 2001; 36 (3): 189-92.
22. Bleich S., Carl M., Bayerlein K., Reulbach U., Biermann T., Hillemecher T. et al. Evidence of increased homocysteine levels in alcoholism: the Franconian alcoholism research studies (FARS). *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2005; 29 (3): 334-6.
23. Heese P., Linnebank M., Semmler A., Muschler M.A., Heberlein A., Frieling H. et al. Alterations of Homocysteine Serum Levels during Alcohol Withdrawal Are Influenced by Folate and Riboflavin: Results from the German Investigation on Neurobiology in Alcoholism (GINA). *Alcohol and Alcoholism*. 2012; 47 (5): 497-500.
24. Lutz U.C. Alterations in homocysteine metabolism among alcohol dependent patients — clinical, pathobiochemical and genetic aspects. *Curr. Drug Abuse Rev.* 2008; 1 (1): 47-55.
25. Ozen C., Yildiz G., Dagcan A.T., Cevik D., Ors A., Keles U. et al. Genetics and epigenetics of liver cancer. *N. Biotechnol.* 2013; 30 (4): 381-4.
26. Purohit V., Khalsa J., Serrano J. Mechanisms of alcohol-associated cancers: introduction and summary of the symposium. *Alcohol*. 2005; 35 (3): 155-60.
27. Ponomarev I., Wang S., Zhang L., Harris R.A., Mayfield R.D. Gene coexpression networks in human brain identify epigenetic modifications in alcohol dependence. *J. Neurosci.* 2012; 32 (5): 1884-97.
28. Esse R., Rocha M.S., Barroso M., Florindo C., Teerlink T., Kok R.M. et al. Protein arginine methylation is more prone to inhibition by S-adenosylhomocysteine than DNA methylation in vascular endothelial cells. *PLoS One*. 2013; 8 (2): e55483.
29. Polotskaia A., Wang M., Patschan S., Addabbo F., Chen J., Goligorsky M.S. Regulation of arginine methylation in endothelial cells: role in premature senescence and apoptosis. *Cell Cycle*. 2007; 6 (20): 2524-30.
30. Perla-Rajan J., Jakubowski H. Paraoxonase 1 and Homocysteine metabolism. *Amino Acids*. 2012; 43 (4): 1405-17.
31. Antoniadou C., Shirodaria C., Warrick N., Cai S., de Bono J., Lee J. et al. 5-methyltetrahydrofolate rapidly improves endothelial function and decreases superoxide production in human vessels effects on vascular tetrahydrobiopterin availability and endothelial nitric oxide synthase coupling. *Circulation*. 2006; 114 (11): 1193-201.
32. Pekarova M., Lojek A., Martiskova H., Vasicek O., Bino L., Klinke A. et al. New Role for L-Arginine in Regulation of Inducible Nitric-Oxide-Synthase-Derived Superoxide Anion Production in Raw 264.7 Macrophages. *Sci. World J.* 2011; 11: 2443-57.
33. Naruszewicz M., Mirkewicz E., Olszewski A.J., McCully K.S. Thiolation of low-density lipoproteins by homocysteine thiolactone causes increased aggregation and altered interaction with cultured macrophages. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 1994; 4: 70-7.
34. Marcus J., Sarnak M.J., Menon V. Homocysteine lowering and cardiovascular disease risk: lost in translation. *Can J Cardiol.* 2007; 23(9):707-10.
35. Undas A., Perla J., Lacinski M., Trzeciak W.H., Kazmierski R., Jakubowski H. Autoantibodies against N-homocysteinylated proteins in humans: implications for atherosclerosis. *Stroke*. 2004; 35: 1299-304.
36. Wang M., Lang X., Cui S., Zou L., Cao J., Wang S., Wu X. Quantitative assessment of the influence of paraoxonase 1 activity and coronary heart disease risk. *DNA Cell Biol.* 2012; 31(6):975-82.
37. Pirillo A., Norata G.D., Catapano A.L. LOX-1, oxLDL, and atherosclerosis. *Mediators of inflammation*. 2013; 2013: 152786.
38. Mackness B., Turkie W., Mackness M. Paraoxonase-1 (PON1) promoter region polymorphisms, serum PON1 status and coronary heart disease. *Arch. Med. Sci.* 2013; 9 (1): 8-13.
39. Shih D.M., Gu L., Xia Y.R., Navab M., Li W.F., Hama S. et al. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*. 1998; 394 (6690): 284-7.
40. Tward A., Xia Y.R., Wang X.P., Shi Y.S., Park C., Castellani L.W. et al. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation*. 2002; 106 (4): 484-90.
41. Atrahimovich D., Vaya J., Khatib S. The effects and mechanism of flavonoid-rePON1 interactions. Structure-activity relationship study. *Bioorg. Med. Chem.* 2013; 21 (11): 3348-55.
42. Borowczyk K., Shih D.M., Jakubowski H. Metabolism and neurotoxicity of homocysteine thiolactone in mice: evidence for a protective role of paraoxonase 1. *J Alzheimers Dis.* 2012; 30(2): 225-31.

43. Suszynska-Zajczyk J., Luczak M., Marczak L., Jakubowski H. Inactivation of the Paraoxonase 1 Gene Affects the Expression of Mouse Brain Proteins Involved in Neurodegeneration. *J. Alzheimers Dis.* 2014; 42 (1): 247-60.
44. Ramesh B.N., Rao T.S., Prakasam A., Sambamurti K., Rao K.S. J. Neuronutrition and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2010; 19(4): 1123-39.
45. Liu J., Chen J., Ehrlich S., Walton E., White T., Perrone-Bizzozero N. et al. Methylation patterns in whole blood correlate with symptoms in schizophrenia patients. *Schizophrenia Bull.* 2014; 40 (40): 769-76.
46. Mabrouk H., Mechria H., Mechri A., Azizi I., Neffati F., Douki W. et al. Paraoxonase 1 activity and lipid profile in schizophrenic patients. *Asian J Psychiatr.* 2014; 9: 36-40.
47. Bortolasci C.C., Vargas H.O., Souza-Nogueira A., Barbosa D.S., Moreira E.G., Nunes S.O. et al. Lowered plasma paraoxonase (PON)1 activity is a trait marker of major depression and PON1 Q192R gene polymorphism-smoking interactions differentially predict the odds of major depression and bipolar disorder. *J Affect Disord.* 2014; 159: 23-30.
48. Blasco-Fontecilla H., Kebir O., Fananas. Further evidence of DEPDC7 DNA hypomethylation in depression: A study in adult twins. *Eur. Psychiatry.* 2015; 4. pii: S0924-9338(15)00087-5.
49. Bayerlein K., Hillemecher T., Reulbach U., Mugele B., Sperling W., Kornhuber J., Bleich S. et al. Alcoholism-associated hyperhomocysteinemia and previous withdrawal seizures. *Biol. Psychiatry.* 2005; 57(12): 1590-3.
50. Lipton S.A., Kim W.K., Choi Y.B., Kumar S., D'Emilia D.M., Rayudu P.V. et al. Neuro-toxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; 94 (11): 5923-8.
51. Muller N., Myint A.M., Schwarz M.J. Inflammatory biomarkers and depression. *Neurotox. Res.* 2011; 19: 308-18.
52. Crawford A., Fassett R.G., Geraghty D.P., Kunde D.A., Ball M.J., Robertson I.K., Coombes J.S. Relationships between single nucleotide polymorphisms of antioxidant enzymes and disease. *Gene.* 2012; 501(2): 89-103.
53. Bhattacharyya T., Nicholls S.J., Topol E.J., Zhang R., Yang X., Schmitt D. et al. Relationship of paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and functional activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk. *JAMA.* 2008; 299 911): 1265-76.
54. Billecke S., Draganov D., Counsell R., Stetson P., Watson C., Hsu C., La Du BN. Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Metab. Dispos.* 2000; 28 (11): 1335-42.
55. McDaniel C.Y., Dail M.B., Wills R.W., Chambers H.W., Chambers J.E. Paraoxonase 1 Polymorphisms Within a Mississippi USA Population as Possible Biomarkers of Enzyme Activities Associated With Disease Susceptibility. *Biochem Genet.* 2014; 52(11-12): 509-23.
56. Gaidukov L., Rosenblat M., Aviram M., Tawfik D.S. The 192R/Q polymorphs of serum paraoxonase PON 1 differ in HDL binding, lipolactonase stimulation, and cholesterol efflux. *J. Lipid Res.* 2006; 47 (11): 2492-502.
57. Jakubowski H., Ambrosius W.T., Pratt J.H. Genetic determinants of homocysteine thiolactonase activity in humans: implications for atherosclerosis. *FEBS Letters.* 2001; 491 (1-2): 35-9.
58. Pejin-Grubisa I. HDL-associated paraoxonase 1 gene polymorphisms as a genetic markers for wide spread diseases. In: Frank S., Kosther G., eds. *Lipoproteins — role in health and diseases.* In Tech. 2012: 431-45.
59. Kolesnikova L.I., Bayrova T.A., Pervushina O.A., Grebyonkina L.A. Association of polymorphism (192) Q> R gene paraoxonase with the lipid profile, components of lipid peroxidation and antioxidant protection in Russian and Buryat populations of Eastern Siberia. *Genetika.* 2015; 51 (2): 236-41. (in Russian)
60. Can Demirdogen B., Turkanoglu A., Bek S., Sanisoglu Y., Demirkaya S., Vural O. et al. Paraoxonase/arylesterase ratio, PON1 192Q/R polymorphism and PON 1 status are associated with increased risk of ischemic stroke. *Clin. Biochem.* 2008; 41 (1-2): 1-9.
61. Litvinov D., Mahini H., Garelnabi M. Antioxidant and Anti-Inflammatory Role of Paraoxonase 1: Implication in Arteriosclerosis Diseases. *N. Am. J. Med. Sci.* 2012; 4 (11): 523-32.
62. Luersen K., Schmelzer C., Boesch-Saadatmandi C., Kohl C., Rimbach G., Doring F. Paraoxonase 1 polymorphism Q192R affects the pro-inflammatory cytokine TNF-alpha in healthy males. *BMC Res. Notes.* 2011; 4: 141.
63. Mahrooz A., Gohari G., Hashemi M.B., Zargari M., Musavi H., Abedini M., Alizadeh A. et al. R-carrying genotypes of serum paraoxonase (PON1) 192 polymorphism and higher activity ratio are related to susceptibility against ischemic stroke. *Mol. Biol. Rep.* 2012; 39 (12): 1177-85.
64. Prakaschandra D.R., Naidoo D. The interaction of common polymorphisms of the lipoprotein lipase and pon1 genes with cardiovascular risk factors in the phoenix community. *Cardiovasc. Res.* 2014; 103 (Suppl 1): S36.
65. Marsillach J., Ferre N., Vila M.C., Lligona A., Mackness B., Mackness M. et al. Serum paraoxonase-1 in chronic alcoholics: relationship with liver disease. *Clin. Biochem.* 2007; 40 (9-10): 645-50.
66. Varatharajulu R., Garige M., Leckey L.C., Gong M., Lakshman M.R. Betaine protects chronic alcohol and omega-3 PUFA-mediated down-regulations of PON1 gene, serum PON1 and homocysteine thiolactonase activities with restoration of liver GSH. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2010; 34 (3): 424-31.

Поступила 10.11.15

Сведения об авторах:

Панченко Леонид Федорович, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, зав. лаб. биохимии НИИН — филиала ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П.Сербского» Минздрава РФ, зав. лаб. молекулярных основ болезней зависимости ФГБУН «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Баронец Валерия Юрьевна, ст. науч. сотр. лаб. биохимии, e-mail: biochn@mail.ru

Пирожков Сергей Викторович, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии

Теребиллина Наталия Николаевна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. биохимии, e-mail: n.terebilina@mail.ru

Шойбонов Батожаб Батожагалович, канд. хим. наук, вед. науч. сотр. лаб. физиологии мотиваций.

Никифоров Н.Г.^{1,2,3}, Елизова Н.В.^{1,3}, Никитина Н.А.⁴, Карагодин В.П.⁵, Орехов А.Н.^{1,3}

Активация макрофагов при атеросклерозе. Сообщение 2. Факторы, влияющие на активацию макрофагов

¹ — «Научно-исследовательский институт атеросклероза», Инновационный центр Сколково, 143025, Сколково, Московская область, Россия, ул. Новая, д. 100

² — ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, 121552, Москва, Россия, ул. 3-я Черепковская, д. 15-а

³ — «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

⁴ — ФГБУН «НИИ физико-химической медицины» ФМБА России, Москва, Россия, ул. Малая Пироговская, д. 1-а

⁵ — ФГБОУ ВПО «Российская экономическая академия им. Г.В. Плеханова», 117997, Россия, Москва, Стремянный переулок, д. 36

При атеросклерозе макрофаги проявляют пластичность фенотипа, а также способны быстро реагировать на изменения в микроокружении. Липиды сыворотки крови, липопротеиды и различные стимулирующие факторы, такие как цитокины, хемокины, другие малые биологически активные молекулы, могут существенно влиять на фенотип макрофагов и вызывать про- или противовоспалительную активацию клеток. Динамика пластичности макрофагов обеспечивается путем активации или подавления транскрипционных факторов, ответственных за поляризацию макрофагов. Понимание механизмов пластичности макрофагов и разгадка функциональных характеристик фенотипов макрофагов поможет в разработке новых подходов в лечении хронического воспаления при сердечно-сосудистых заболеваниях.

Ключевые слова: атеросклероз; макрофаги; моноциты; активация; воспаление; липопротеиды; липиды

Для цитирования: Никифоров Н.Г., Елизова Н.В., Никитина Н.А., Карагодин В.П., Орехов А.Н. Активация макрофагов при атеросклерозе. Сообщение 2: Факторы, влияющие на активацию макрофагов. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016; 60(1): 59–64

Благодарности. Работа проведена при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект 14-04-00364).

Nikiforov N.G.^{1,2,3}, Elizova N.V.^{1,3}, Nikitina N.A.⁴, Karagodin V.P.⁵, Orekhov A.N.^{1,3}

Macrophage activation in atherosclerosis. Message 2. Effects of factors on macrophage activation

¹ — Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Centre (143025, Skolkovo, Moscow Region, Russia, Novaya street, 100)

² — Federal State Institute «Russian Production Complex of Cardiology Research» of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation (121552, Moscow, 3th Cherepkovskaya street, 15-a)

³ — Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia (125315, Moscow, Baltiyskaya street, 8)

⁴ — Federal Medical & Biological Agency SRI of Physical-Chemical Medicine (Russia, 119435, Moscow, Malaya Pirogovskaya, 1-a)

⁵ — Plekhanov Russian University of Economics (117997, Russia, Moscow, Stremyanny Pereulok, 36)

In atherosclerosis, macrophages demonstrate phenotypic plasticity to rapidly adjust to changing microenvironmental conditions. In the plaque, serum lipids, serum lipoproteins and various pro- or anti-inflammatory stimuli such as cytokines, chemokines and small bioactive molecules could greatly influence the macrophage phenotype inducing switch towards more proinflammatory or anti-inflammatory properties. Dynamic plasticity of macrophages is achieved by up-regulation and down-regulation of overlapping set of transcription factors that drive macrophage polarization. Understanding of mechanisms of macrophage plasticity and resolving functional characteristics of distinct macrophage phenotypes should help in the development of new strategies for treatment of chronic inflammation in cardiovascular disease.

Keywords: atherosclerosis; macrophage; monocyte; activation; inflammation; lipoproteins; lipids

For citation: Nikiforov N.G., Elizova N.V., Nikitina N.A., Karagodin V.P., Orekhov A.N. Macrophage activation in atherosclerosis. Message 2: Effects of factors on macrophage activation. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2016; 60(1): 59–64. (in Russian)

Funding. Supported by Russian Scientific Foundation (Grant №14-04-00364).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

For correspondense: Nikiforov Nikita G., nikiforov.mipt@googlegmail.com

Исследования последних лет свидетельствуют о функциональной пластичности фенотипа макрофагов, который изменяется под влиянием различных факторов. Настоящая статья посвящена обзору изменений фенотипа макрофагов при взаимодействии с различными факторами.

Влияние липидов на фенотип макрофагов

Макрофаги идентифицируют модифицированные липиды через рецепторы TLR2 и TLR4. Скэвенджер рецептор CD36, который связывается с окисленными ЛНП, образует комплексы с гетеродимерами TLR и, в свою очередь, определяет провоспалительный эффект модифицированных липидов. Активация TLR проатерогенными модифицированными липидами приводит к активации провоспалительных сигнальных путей, включающих NFκB, MAP-киназы, и АФК-зависимые сигналы. Экспрессия провоспалительных генов меняет фенотип макрофагов на M1. К тому же стимулированный рецептор CD36 вызывает активацию инфламасом, что еще более усугубляет процесс воспаления [1].

Липиды

как индукторы провоспалительного ответа

Модификация липидов сыворотки и липопротеидов является важным этапом инициации атеросклероза. Поглощение окисленных ЛНП M2 макрофагами изменяет их фенотип в сторону провоспалительной активации. Изменение фенотипа сопровождается подавлением противовоспалительного фактора Nrf2, который контролирует экспрессию антиоксидантных белков и уменьшает окислительный стресс.

TLR4 играет ключевую роль в провоспалительной активации макрофагов при взаимодействии с модифицированными липопротеидами. Минимально модифицированные ЛНП связываются с TLR4 и вызывают экспрессию протеинкиназ C и Syk, а также активацию NADPH оксидазы 2 (gp91/Nox2), которая приводит к увеличению продукции АФК и индукции провоспалительного фенотипа клетки. Nox2 необходим для индукции экспрессии таких провоспалительных цитокинов, как ИЛ-1β и ССЛ5. Минимально модифицированные ЛНП в присутствии небольшого количества ЛПС стимулируют TLR4 [2].

Окисленные фосфолипиды индуцируют экспрессию провоспалительного набора генов в макрофагах, но могут как активировать, так и ингибировать TLR-опосредованный сигналинг. Более того, окисленные фосфолипиды меняют фенотип макрофагов M1 и M2 на Mox путем активации Nrf2, который затем вызывает экспрессию антиоксидантных детокси-

кационных генов. Mox макрофаги играют специфическую роль в атерогенезе, так как они имеют ограниченные возможности для фагоцитоза и миграции. Nrf2-зависимый антиоксидантный сигналинг, как правило, антиатерогенный и может предотвратить воспалительную активацию и формирование пенистых клеток с помощью индукции гемоксигеназы-1. Повышенная экспрессия Nrf2 также приводит к активации инфламмасомного криопирин (NLRP3), что, в свою очередь, вызывает проатерогенный эффект [3].

Было показано, что у мышей без ЛНП-рецептора (ЛНПР), кристаллы холестерина вызывали атеросклероз, посредством стимуляции инфламмасомного криопирин через Nrf2, который обеспечивает изменение фенотипа от M1 и M2 макрофагов на Mox. Кристаллы холестерина, как правило, образуются на поздних стадиях атеросклероза и, следовательно, могут влиять на прогрессирование атеросклероза и поздние атеросклеротические осложнения. Однако крошечные кристаллы холестерина были обнаружены в ранних очагах поражения и у людей, и у Апо-Е-мышей. Кристаллы, фагоцитируемые макрофагами, могут повреждать лизосомы и вызывать утечку различных модуляторов, например, катепсина, в цитоплазму, где они могут стимулировать NLRP3. Активация инфламмасом вызывает повышенную продукцию ИЛ-1β и ИЛ-18. Таким образом, мелкие кристаллы холестерина, сформированные в начальном поражении, могут способствовать воспалению через инфламмасомы [4,5].

В липидном ядре холестерин и жирные кислоты производят эфиры холестерина, которые подвержены сильному окислению, особенно если эфир состоит из ненасыщенных ацильных цепей. Окисленные эфиры холестерина биологически активны и способны стимулировать макрофаги. Эфиры холестерина вызывают провоспалительную активацию макрофагов и приводят к формированию пенистых клеток через пиноцитоз и TLR4. Различные виды эфиров холестерина используют разные способы провоспалительной индукции [2]. Следует отметить, что окисленные фосфолипиды и сложные эфиры холестерина могут способствовать образованию пенистых клеток. Окисленные эфиры холестерина усиливают экспрессию CD36. Некоторые формы окисленных фосфолипидов могут связываться не только с CD36, но и со скэвенджер рецептором V1, который также связывается с эфирами холестерина. Уменьшение экспрессии CD36 путем стимуляции интегринов αMβ2 препятствует формированию пенистых клеток и провоспалительной активации макрофагов, т.е. можно предположить, что CD36 играет проатерогенную роль.

Оксистеролы обладают биологической активностью, так как они способны взаимодействовать с X

рецептором печени, влияя на метаболизм липидов и воспаление. При взаимодействии с окисленными ЛНП в моноцитах повышается экспрессия связанного с оксистеролом белка ORP9. В макрофагах оксистеролы также способны вызывать экспрессию провоспалительного хемокина CCL2 и CD36, тем самым способствуя провоспалительной поляризации макрофагов [6].

Кислое микроокружение атеросклеротической бляшки может стимулировать опосредованный фосфолипазой гидролиз липопротеидов, что может привести к высвобождению свободных жирных кислот и фосфолипидов. В кислой среде, способность альбумина связывать свободные жирные кислоты и фосфолипиды снижается. Лечение липазой А2 приводит к образованию атерогенных продуктов, которые усиливают липоидоз, стимулируют формирование пенистых клеток и повышают секрецию ФНО- α и ИЛ6.

Насыщенные жирные кислоты способствуют провоспалительной поляризации макрофагов путем активации рецептора окисленных ЛНП 1, а также при взаимодействии с TLR2 и TLR4, которые вызывают экспрессию провоспалительных генов. Провоспалительный эффект насыщенных жирных кислот может подавляться полиненасыщенными жирными кислотами [2].

Влияние провоспалительных липидных модуляторов на фенотип макрофагов

Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) индуцируют противовоспалительные свойства в макрофагах. Следует отметить, что ПНЖК часто противодействуют насыщенным жирным кислотам, препятствуя провоспалительной активации макрофагов. ПНЖК ингибируют пальмитат-индуцированное увеличение экспрессии LOX1 и продукцию связывающего жирные кислоты белка (FABP) [3]. Конъюгированная линолевая кислота уменьшает прогрессирование атеросклероза у мышей с помощью механизма протекающего в пероксисомах. В этом механизме используется рецептор-активатор пролиферации γ (PPAR γ), при этом наблюдается снижение экспрессии провоспалительных генов, таких, как NF κ B, CCL2, MMP-9, а также фосфолипазы 2 и циклооксигеназы 2, специфичных для макрофагов.

Обычно окислительный стресс приводит к нарушению продукции NO и образованию реактивных форм азота (РФА). РФА обладают высокой реакционной способностью и взаимодействуют с жирными кислотами, что приводит к образованию нитро-жирных кислот (НЖК) [3]. НЖК проявляют противовоспалительные свойства с помощью активации Nrf2 и PPAR γ [1, 7]. Атеропротективные эффекты НЖК показаны для АпоЕ-дефицитных мы-

шей. У мышей, получавших НЖК, замедлялась скорость развития очагов атеросклеротических изменений, уменьшалось количество провоспалительных клеток и снижалось образование пенистых клеток. Антиатеросклеротические эффекты НЖК достигаются подавлением LOX1-индуцированного фосфорилирования STAT-1 (переносчика сигнала и активатора транскрипции), который способствует образованию пенистых клеток из макрофагов [6]. У мышей, получавших НЖК, формируются стабильные бляшки как результат увеличения отложения коллагена в покрышке бляшки, а также индуцированного НЖК подавления продукции MMP-9 и MMP-12 в макрофагах [8].

Давно известно, что ω -3-жирные кислоты обладают антиатерогенными свойствами [9—11]. У Ldlr-дефицитных мышей нарушенная способность макрофагов к фагоцитозу апоптотных клеток улучшается при введении эйкозапентаеновой и дигидроаскорбиновой (ДГА) кислот. В макрофагах COX-2 генерирует широкий спектр провоспалительных продуктов, таких, как липоксины А4 и В4, мазерины, протектины и резолвины из ω -3-жирных кислот, и, в особенности, из ДГА [10]. Эти медиаторы оказывают благоприятное воздействие на очаги атеросклеротического повреждения, уменьшают выраженность воспалительной реакции сосудов за счет улучшения функции и стимулирования противовоспалительных свойств в макрофагах [5, 12].

Липопротеины высокой плотности (ЛПВП) обладают атеропротективными свойствами за счет стимуляции обратного транспорта холестерина. ЛПВП захватывают холестерин из пенистых клеток и переносят эфиры холестерина в богатые триглицеридами частицы для создания хиломикрон [13]. В модели атеросклероза у мышей нормализация уровней ЛПВП в сыворотке привела к снижению количества провоспалительных макрофагов в бляшках и увеличению в М2 макрофагах таких маркеров, как CD163, аргиназа-1 (Arg-1) и FIZZ1 (обнаруживается в зоне воспаления) [14]. Было показано, что существует STAT6 опосредованное влияние ЛПВП на экспрессию атеропротективного Arg-1 и фактора транскрипции FIZZ1 [15]. Arg-1 утилизирует аргинин, субстрат индуцибельной NO-синтазы, и, следовательно, уменьшает продукцию NO, наличие которого является характерным свойством провоспалительных М1 макрофагов. FIZZ1 индуцируется IL-4 и стимулирует синтез коллагена и α -актина гладких мышц в гладкомышечных клетках сосудов (ГМКС), за счет чего способствует стабилизации бляшек [16]. Тем не менее, функция FIZZ1 в макрофагах не ясна.

Влияние факторов транскрипции на фенотип макрофагов

Недавние исследования подтвердили роль факторов транскрипции и ядерных рецепторов в изменении фенотипа макрофагов при атеросклерозе. Ядерные рецепторы $\text{PPAR}\gamma$ и $\text{PPAR}\delta$ участвуют в формировании противовоспалительного фенотипа M2 , в ответ на связывание жирных кислот происходит увеличение транскрипции $\text{PPAR}\gamma$ и $\text{PPAR}\delta$ [17,18]. В очагах поражения сонной артерии человека экспрессия $\text{PPAR}\gamma$ коррелирует с экспрессией маркеров M2 , таких, как IL-10 , MR , и CC-хемокина AMAC1 , ассоциированного с альтернативной активацией макрофагов. В M1 макрофагах для получения энергии используется гликолиз, тогда как в M2 макрофагах преимущественно окисляются жиры. $\text{PPAR}\gamma$ регулирует экспрессию генов, ответственных за связывание жирных кислот, таких, как CD36 . Действительно, индукция $\text{PPAR}\gamma$ или $\text{PPAR}\delta$ в макрофагах M1 переключает метаболизм липидов на окисление жирных кислот и это, в свою очередь, приводит к формированию фенотипа M2 [19]. Индукция $\text{PPAR}\delta$ под воздействием ПНЖК проявляла синергические эффекты с IL-4 в процессе индукции такого маркера M2 , как Arg-1 [18].

В макрофагах накопление окисленных и других модифицированных форм холестерина активирует транскрипционные факторы $\text{LXR}\alpha$ и $\text{LXR}\beta$. Транскрипционная активность обоих факторов возрастает по мере увеличения внутриклеточной концентрации холестерина для регуляции экспрессии генов в соответствии с содержанием холестерина в цитоплазме. LXR активируют экспрессию таких генов, как ABCA1 , ABCG1 и ApoE , белковые продукты этих генов участвуют в процессах выведения холестерина. Действительно, индукция LXR в макрофагах приводит к увеличению оттока холестерина, который затем захватывается и утилизируется ЛПВП [20]. Синтетические агонисты LXR уменьшают проявления атеросклероза в мышинных моделях атеросклероза [21].

В дополнение к контролю уровня внутриклеточного холестерина транскрипционные факторы LXR участвуют в инициации секреции IL-10 посредством протеинкиназы A -зависимого пути [22]. LXR также могут регулировать воспалительную реакцию путем активации экспрессии регулирующего фактора интерферона 8 (IRF8), который, в свою очередь, взаимодействует с фактором транскрипции PU.1 и индуцирует экспрессию Arg-1 . В действительности, LXR способствуют экспрессии как минимум двух маркеров M2 , таких, как Arg-1 и IL-10 . LXR могут подавлять активность факторов транскрипции $\text{NF}\kappa\text{B}$ и AP-1 за счет стабилизации комплексов репрессоров тран-

скрипции в промоторных областях воспалительных генов. Механизм подавления требует стимуляции LXR [23].

Активация TLR -опосредованного воспалительного сигналинга подавляла активность LXR , которая, в свою очередь, ассоциирована с дальнейшим уменьшением экспрессии ABCA1 и уменьшением оттока холестерина [24]. Макрофаги, подвергнутые воздействию гемоглобина в культуре, уменьшают продукцию AФК в связи с гемоглобин-опосредованной активацией ATF1 и ATF -зависимой индукцией экспрессии гемоглобин-оксидазы 1 и $\text{LXR}\beta$. Затем $\text{LXR}\beta$ уменьшает экспрессию $\text{LXR}\alpha$ и ABCA1 , которые, в свою очередь, увеличивают отток холестерина и продукцию IL-10 [11]. Эти данные свидетельствуют о том, что макрофаги обладают компенсирующим механизмом регуляции экспрессии генов в соответствии с уровнем холестерина и наличием про- или противовоспалительных сигналов.

Эстрогены проявляют биологическую активность, связываясь с рецепторами эстрогена ($\text{ER}\alpha$ и $-\beta$). Специфичное для миелоидных клеток выключение ядерного рецептора $\text{ER}\alpha$ приводит к прогрессированию атеросклеротических бляшек у мышей. Ядерный рецептор $\text{ER}\alpha$ участвует в регуляции функциональной активности макрофагов. Транскрипционная активность $\text{ER}\alpha$ регулируется коактиватором $\text{PPAR}, 1\beta$ ($\text{PGC-1}\beta$). IL-4 и $\text{ER}\alpha$ участвуют в индукции $\text{PGC-1}\beta$ по STAT6 -зависимому пути. Активация $\text{PGC-1}\beta$ в макрофагах приводит к активации генов, участвующих в митохондриально-зависимом окислении липидов, а затем к индукции фенотипа M2 . Активация фенотипа M2 ассоциируется с усилением окисления и усилением продукции AФК , необходимым для элиминации апоптотных клеток. Активация $\text{ER}\alpha$ необходима для индукции нескольких маркеров M2 , включая $\text{PPAR}\gamma/\delta$, $\text{TGF-}\beta$, и транскламиназу 2 (TGM2), она сопровождается ингибированием экспрессии провоспалительных цитокинов $\text{IL-1}\beta$, IL-6 и $\text{IFN-}\gamma$ [25].

У мышей Kruppel -подобный фактор 4 (KLF4) вызывает поляризацию макрофагов в сторону провоспалительного фенотипа M1 путем прямой стимуляции экспрессии активных форм азота и уменьшения ответа макрофагов на сигналы $\text{TGF-}\beta 1$ и SMAD . В макрофагах KLF4 может индуцироваться за счет стимуляции $\text{IFN-}\gamma$, ЛПС и $\text{ФНО}\alpha$ и подавляться под действием $\text{TGF-}\beta$. ЛПВП активируют KLF4 в моноцитах периферической крови и макрофагах, что, в свою очередь, приводит к активации экспрессии проатерогенного сквенджер-рецептора 1 класса В (SRB1), который связывает ЛПВП. Проатерогенная роль KLF4 была подтверждена при введении

АроЕ-накаутным мышам со встроенной в геном лентивирусной конструкцией VSMC ответственной за синтез микроРНК (miR)-145, мишенью которой является KLF4. Опосредованное MiR-145 ингибирование KLF4 в ГМК артерии приводит к существенному уменьшению размеров бляшек в артериях, снижению накопления макрофагов, увеличению площади фиброзной крышки и усилению синтеза коллагена, альфа-актина гладкомышечных клеток и миокардина в стенке артерии [26].

Еще один член семейства транскрипционных факторов KLF (KLF6) также индуцирует провоспалительные свойства в макрофагах человека и мышей путем ингибирования экспрессии PPAR γ и взаимодействия с NF κ B в процессе активации экспрессии провоспалительных генов. Экспрессия KLF6 индуцируется окислительным стрессом в ответ на АФК-опосредованное повреждение ткани [13]. Данные о влиянии KLF6 на макрофаги при атеросклерозе отсутствуют. Тем не менее, недавно проведенное компьютерное моделирование показало, что KLF6 может отвечать за базальную экспрессию TGF- β 1 в сосудах, причем активация KLF6 ассоциируется с развитием атеросклеротических бляшек, что свидетельствует в пользу потенциального атерогенного эффекта этого фактора транскрипции [27].

Семейство ядерных рецепторов NR4A включает в себя три типа факторов, способных модулировать фенотип макрофагов у мышей (NR4A1-NR4A3). При этом NR4A1 в высокой степени экспрессируется в циркулирующих или оседлых макрофагах LyC6C-CCR2-CXCR1hiCD62L, которые дополнительно дифференцированы в M2 клетки [18]. У мышей, дефицитных по NR4A1, образуются провоспалительные M1 макрофаги со сниженной экспрессией IL-12, iNOS, ФНО- α и повышенной экспрессией Arg-1. Однако данные о способности NR4A1 или NR4A3 переключать фенотип макрофагов были поставлены под сомнение Чоао и др. Авторы привели NR4A1- и NR4A3-дефицитные предшественники кроветворных клеток Ldlr-дефицитным мышам и не обнаружил никаких изменений в фенотипе макрофагов в сторону M1 [28]. Кроме того, существуют данные об атеропротективном эффекте семейства NR4A в макрофагах бляшек человека [29]. В действительности, противоречивые данные позволяют предположить, что факторы NR4A вряд ли играют важную роль в формировании фенотипических изменений в макрофагах. Кроме того, M1-подобные макрофаги, обнаруженные у NR4A1-дефицитных мышей, экспрессируют пониженные уровни маркеров M1, таких, как IL-12 и активных форм азота, но более высокие уровни Arg-1, маркера M2.

Выводы

Промежуточное состояние макрофагов обеспечивает динамическую пластичность клеток в зоне атеросклеротических поражений, способность активировать или ингибировать широкий спектр факторов транскрипции в ответ на внешние сигналы, а также способность изменять свой фенотип для приспособления к изменяющимся условиям микроокружения, в особенности, в ответ на изменения уровня липидов и АФК.

References

1. Bonacci G, Schopfer FJ, Batthyany CI, Rudolph TK, Rudolph V, Khoo NK, Kelley EE, Freeman BA. Electrophilic fatty acids regulate matrix metalloproteinase activity and expression. *J Biol Chem.* 2011; 286(18):16074-81. doi: 10.1074/jbc.M111.225029.
2. Ma L, Dong F, Zaid M, Kumar A, Zha X. ABCA1 protein enhances toll-like receptor 4 (TLR4)-stimulated interleukin-10 (IL-10) secretion through protein kinase A (PKA) activation. *J Biol. Chem.* 2012; 287(48):40502-12. doi: 10.1074/jbc.M112.413245.
3. Kansanen E, Bonacci G, Schopfer FJ, Kuosmanen SM, Tong KI, Leinonen H, Woodcock SR, Yamamoto M, Carlberg C, Yla-Herttuala S, Freeman BA, Levenon AL. Electrophilic nitro-fatty acids activate NRF2 by a KEAP1 cysteine 151-independent mechanism. *J Biol Chem.* 2011; 286(16):14019-27. doi: 10.1074/jbc.M110.190710.
4. Chao LC, Soto E, Hong C, Ito A, Pei L, Chawla A, Conneely OM, Tangirala RK, Evans RM, Tontonoz P. Bone marrow NR4A expression is not a dominant factor in the development of atherosclerosis or macrophage polarization in mice. *J Lipid Res.* 2013; 54(3):806-15. doi: 10.1194/jlr.M034157.
5. Feig JE, Rong JX, Shamir R, Sanson M, Vengrenyuk Y, Liu J, Rayner K, Moore K, Garabedian M, Fisher EA. HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108(17):7166-71. doi: 10.1073/pnas.1016086108.
6. Groeger AL, Cipollina C, Cole MP, Woodcock SR, Bonacci G, Rudolph TK, Rudolph V, Freeman BA, Schopfer FJ. Cyclooxygenase-2 generates anti-inflammatory mediators from omega-3 fatty acids. *Nat Chem Biol.* 2010; 6(10):433-41. doi: 10.1038/nchembio.367.
7. Rudolph TK, Rudolph V, Edreira MM, Cole MP, Bonacci G, Schopfer FJ, Woodcock SR, Franek A, Pekarova M, Khoo NK, Hasty AH, Baldus S, Freeman BA. Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30(5):938-45. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.201582.
8. Merched AJ, Ko K, Gotlinger KH, Serhan CN, Chan L. Atherosclerosis: evidence for impairment of resolution of vascular inflammation governed by specific lipid mediators. *FASEB J.* 2008; 22(10):3595-06. doi: 10.1096/fj.08-112201.
9. Boyle JJ, Harrington HA, Piper E, Elderfield K, Stark J, Landis RC, Haskard DO. Coronary intraplaque hemorrhage evokes a novel atheroprotective macrophage phenotype. *Am J Pathol.* 2009; 174(3):1097-108. doi: 10.2353/ajpath.2009.080431.
10. Grover V, Malhotra R, Kapoor A, Singh J, Sachdeva S. Proresolution mediators and receptors: novel drug targets for enhancing pharmacological armamentarium against periodontal inflammation. *Infect Disord Drug Targets.* 2013; 13(1):75-84. doi: 10.2174/18715265112129990034.

11. Lovren F, Pan Y, Quan A, Singh KK, Shukla PC, Gupta N, Steer BM, Ingram AJ, Gupta M, Al-Omran M, Teoh H, Marsden PA, Verma S. MicroRNA-145 targeted therapy reduces atherosclerosis. *Circulation*. 2012; 126(11 Suppl 1):S81-90. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.084186.
12. Rader DJ. Molecular regulation of HDL metabolism and function: Implications for novel therapies. *J Clin Invest*. 2006; 116(12):3090-100. doi:10.1172/JCI30163.
13. Sanson M, Distel E, Fisher EA. HDL induces the expression of the M2 macrophage markers arginase 1 and Fizz-1 in a STAT6-dependent process. *PLoS One*. 2013;8:e74676. doi:10.1371/journal.pone.0074676.
14. Chen H, Jacobson BA, Mason L, Wolf SF, Bowman MR. FIZZ1 potentiates the carbachol-induced tracheal smooth muscle contraction. *Eur Respir J*. 2010; Nov; 36(5):1165-73. doi: 10.1183/09031936.00097609.
15. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, Eagle AR, Vats D, Brombacher F, Ferrante AW, Chawla A. Macrophage-specific ppargamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature*. 2007;447(7148):1116-20. doi: 10.1038/nature05894.
16. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Red Eagle A, Vats D, Morel CR, Goforth MH, Subramanian V, Mukundan L, Ferrante AW, Chawla A. Alternative M2 activation of Kupffer cells by ppardelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab*. 2008; 7960:496-507. doi: 10.1016/j.cmet.2008.04.003.
17. Kang K, Reilly SM, Karabacak V, Gangl MR, Fitzgerald K, Hatano B, Lee CH. Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab*. 2008; 7:485-95.
18. Spann NJ, Garmire LX, McDonald JG, Myers DS, Milne SB, Shibata N, Reichart D, Fox JN, Shaked I, Heudobler D, Raetz CR, Wang EW, Kelly SL, Sullards MC, Murphy RC, Merrill AH Jr, Brown HA, Dennis EA, Li AC, Ley K, Tsimikas S, Fahy E, Subramanian S, Quehenberger O, Russell DW, Glass CK. Regulated accumulation of desmosterol integrates macrophage lipid metabolism and inflammatory responses. *Cell*. 2012; 151(1):138-52. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.054.
19. Joseph SB, McKilligan E, Pei L, Watson MA, Collins AR, Laffitte BA, Chen M, Noh G, Goodman J, Hagger GN, Tran J, Tippin TK, Wang X, Lusis AJ, Hsueh WA, Law RE, Collins JL, Willson TM, Tontonoz P. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99(11):7604-9. doi: 10.1073/pnas.112059299.
20. Joseph SB, Bradley MN, Castrillo A, Bruhn KW, Mak PA, Pei L, Hogenesch J, O'Connell RM, Cheng G, Saez E, Miller JF, Tontonoz P. LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell*. 2004; 119(2):299-309. doi: 10.1016/j.cell.2004.09.032.
21. Ghisletti S, Huang W, Ogawa S, Pascual G, Lin ME, Willson TM, Rosenfeld MG, Glass CK. Parallel sumoylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Mol Cell*. 2007; 25(1):57-70. doi: 10.1016/j.molcel.2006.11.022.
22. Merched AJ, Ko K, Gotlinger KH, Serhan CN, Chan L. Atherosclerosis: evidence for impairment of resolution of vascular inflammation governed by specific lipid mediators. *FASEB J*. 2008; 22(10):3595-06. doi: 10.1096/fj.08-112201.
23. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, Eagle AR, Vats D, Brombacher F, Ferrante AW, Chawla A. Macrophage-specific ppargamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature*. 2007; 447(7148):1116-20. doi: 10.1038/nature05894.
24. Ribas V, Drew BG, Le JA, Soleymani T, Daraei P, Sitz D, Mohammad L, Henstridge DC, Febbraio MA, Hewitt SC, Korach KS, Bensinger SJ, Hevener AL. Myeloid-specific estrogen receptor alpha deficiency impairs metabolic homeostasis and accelerates atherosclerotic lesion development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(39):16457-62. doi: 10.1073/pnas.1104533108.
25. Tits LJ, Stienstra R, van Lent PL, Netea MG, Joosten LA, Stalenhoef AF. Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: a crucial role for Kruppel-like factor 2. *Atherosclerosis*. 2011; 214: 345-9.
26. Dhaouadi N, Li JY, Feugier P, Gustin MP, Dab H, Kacem K, Bricca G, Cerutti C. Computational identification of potential transcriptional regulators of TGF- β 1 in human atherosclerotic arteries. *Genomics*. 2014; 103(5-6): 357-70. doi: 10.1016/j.ygeno.2014.05.001.
27. Hanna RN, Carlin LM, Hubbeling HG, Nackiewicz D, Green AM, Punt JA, Geissmann F, Hedrick CC. The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C⁺ monocytes. *Nat Immunol*. 2011; 12(8):778-85. doi: 10.1038/ni.2063.
28. Leitinger N, Schulman IG. Phenotypic polarization of macrophages in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33(6):1120-6. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300173.
29. Bonta PI, van Tiel CM, Vos M, Pols TW, van Thienen JV, Ferreira V, Arkenbout EK, Seppen J, Spek CA, van der Poll T, Pannekoek H, de Vries CJ. Nuclear receptors Nur77, Nur1, and NOR-1 expressed in atherosclerotic lesion macrophages reduce lipid loading and inflammatory responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26(10):2288-94. doi: 10.1161/01.ATV.0000238346.84458.5d.

Поступила 11.09.15

Сведения об авторах:

Елизова Наталья Владимировна, аспирант ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Никитина Надежда Александровна, ст. науч. сотр. лаб. молекулярной иммунологии и биохимии ФГБУН «НИИ физико-химической медицины» России, e-mail: nikitinanadyaa@mail.ru

Карагодин Василий Петрович, канд. биол. наук, доцент «Российского экономического университета им. Г.В. Плеханова», e-mail: vprka@mail.ru

Орехов Александр Николаевич, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Сухоруков В.Н.¹, Карагодин В.П.³, Орехов А.Н.^{1,2}

Современные подходы к дифференциальной диагностике дислипидемий

¹ — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, Россия

² — «НИИ атеросклероза» (Сколково), а/я № 21, 121609, Москва, Россия

³ — ФГБОУ ВПО «Российская экономическая академия им. Г.В. Плеханова», 117997, Москва, Россия

Дислипидемия — нарушение обмена липидов и липопротеинов. Под дислипидемией чаще всего понимают гиперлипидемию, которая характеризуется аномально повышенным уровнем липидов и/или липопротеинов в крови человека. Различные нарушения метаболизма липидов и липопротеинов широко распространены среди населения в целом, и из-за их влияния на атеросклероз рассматриваются как модифицируемые факторы риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. В основе первичной дислипидемии, как правило, лежат различные генетические причины, в то время как в основе вторичной дислипидемии находятся другие причины, такие как, например, диабет. Таким образом, необходимо вовремя диагностировать дислипидемии, так как они являются важным фактором развития атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний. Данный обзор посвящен современным методам диагностики дислипидемий.

Ключевые слова: дислипидемия; гиперлипидемия; диагностика; атеросклероз; сердечно-сосудистые заболевания

Для цитирования: Сухоруков В.Н., Карагодин В.П., Орехов А.Н. Современные подходы к дифференциальной диагностике дислипидемий. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016; 60(1): 65–72.

Работа проведена при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Минобрнауки России (проект RFMEFI61614X0010).

Sukhorukov V.N.¹, Karagodin V.P.³, Orekhov A.N.^{1,2}

Modern methods of diagnosis dyslipidemia

¹ — Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, 8, Baltiyskaya Str., 125315, Moscow, Russia

² — Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Center, PO Box #21, 121609, Moscow, Russia

³ — Plekhanov Russian University of Economics, 117997, Russia, Moscow, Stremlyannoy Pereulok, 36

Dyslipidemia is abnormalities of lipid and lipoprotein metabolism. Most dyslipidemias are hyperlipidemias; that is an abnormally high level of lipids and/or lipoproteins in the blood. Lipid and lipoprotein abnormalities are common in the general population, and are regarded as a modifiable risk factor for cardiovascular disease due to their influence on atherosclerosis. Primary dyslipidemia is usually due to genetic causes, while secondary dyslipidemia arises due to other underlying causes such as diabetes mellitus. Thus, dyslipidemia is an important factor in the development of atherosclerosis and cardiovascular diseases therefore, it is important to diagnose it in time. This review focuses on the modern methods of diagnosis of dyslipidemia.

Keywords: dyslipidemia; hyperlipidemia; diagnostics; atherosclerosis; cardiovascular diseases

For citation: Sukhorukov V.N., Karagodin V.P., Orekhov A.N. Modern methods of diagnosis dyslipidemia. Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya. 2016; 60(1): 65–72. (in Russian)

For correspondence: Sukhorukov V.N., e-mail: vnsukhorukov@gmail.com

Funding. The research was implemented with a financial support of Russian Foundation for Basic Research (project RFMEFI61614X0010)

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

В развитых странах среди заболеваний обмена веществ одно из центральных мест занимают нарушения обмена липидов. Липиды представляют из себя жиры или жироподобные органические вещества, которые либо поглощаются из пищи, либо синтезируются печенью. Все липиды являются физиологически важными, однако, триглицериды (ТГ) и холестерин (ХС) вно-

сят наибольший вклад в указанные болезни [1]. Основная функция ТГ — хранение энергии в адипоцитах и мышечных клетках; ХС является обязательным компонентом клеточных мембран, стероидов, желчных кислот и сигнальных молекул. Все липиды являются гидрофобными и в основном нерастворимы в крови, поэтому их транспорт в крови осуществляется

в гидрофильных, сферических структурах, называемых липопротеинами, которые содержат поверхностные белки (аполипопротеины). Липопротеины классифицируются по размеру и плотности (определяется как отношение липида к белку) и имеют важное значение потому что высокий уровень липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и низкий уровень липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) являются основными факторами риска развития атеросклероза [2]. Липопротеины можно разделить на различные классы путем ультрацентрифугирования плазмы крови в ступенчатом градиенте плотности. Всего на данный момент выделяют следующие основные классы липопротеинов: хиломикроны (ХМ), липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП), ЛПНП и ЛПВП [3].

Метаболизм липидов может нарушаться несколькими путями, приводя к изменению функции липопротеинов плазмы или их уровня. Эти нарушения сами по себе, а также в сочетании с другими факторами риска развития заболеваний сердечно-сосудистой системы (ССС) могут приводить к развитию атеросклероза. Развитие дислипидемий может быть обусловлено другими заболеваниями (вторичные дислипидемии) или сочетанием наследственной предрасположенности и неблагоприятных факторов окружающей среды. Наибольшее внимание привлекает повышение уровня общего холестерина (ОХ) и холестерина липопротеинов низкой плотности (Х-ЛПНП). На эти показатели можно повлиять изменением образа жизни и приемом лекарственных препаратов. Свидетельства того, что снижение уровня ОХ и Х-ЛПНП способствует уменьшению риска развития заболеваний ССС, являются убедительными и основываются на результатах многих рандомизированных контролируемых исследований. Таким образом, уровень ОХ и Х-ЛПНП продолжат

оставаться основной мишенью терапии. Помимо повышения уровня ОХ и Х-ЛПНП некоторые другие типы дислипидемий также способствуют увеличению риска развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). Наиболее распространено определенное сочетание, которое получило название атерогенной липидной триады. Эта триада включает повышение уровня ремнантов (липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП)), которое проявляется умеренным повышением уровня триглицеридов (ТГ), увеличением количества малых частиц ЛПНП и снижением уровня холестерина липопротеинов высокой плотности (Х-ЛПВП) [4, 5]. В то же время, данные клинических исследований, нацеленных на оценку эффективности и безопасности воздействия на перечисленные факторы для снижения риска развития ССЗ, ограничены; поэтому указанная триада и ее отдельные компоненты должны рассматриваться как дополнительные мишени при проведении профилактики заболеваний сердечно-сосудистой системы [6].

Классификация и этиология дислипидемий

Дислипидемии традиционно классифицируют по характеру повышения уровня липидов и липопротеинов, данная классификация была предложена Фредриксоном (Fredrickson, Lees 1965) в 1965 г. и остается самой распространенной классификацией на сегодняшний день (таблица).

Позже классификация Фредриксона была принята Всемирной организацией здравоохранения в качестве международной стандартной номенклатуры гиперлипидемий. Однако она не учитывает уровень ЛПВП, который является важным фактором, снижающим риск атеросклероза, а также роль генов, вызывающих липидные нарушения [7, 8].

Таблица

Классификация гиперлипидемий по Фредриксону с модификациями (по Fredrickson, Lees 1965)

Фенотип	Синонимы	Повышенные липопротеины	Повышенные липиды	Причина	
I	a	Семейная гиперхиломикронемия	Хиломикроны	ТГ	Пониженная липопротеинлипаза (ЛПЛ)
	b	Недостаточность аполипопротеина С2			Измененный белок апоС2
	c	—			Ингибитор ЛПЛ в крови
II	a	Семейная гиперхолестеринемия	ЛПВП	Холестерин	Недостаточность рецепторов к ЛПНП
	b	Комбинированная гиперлипидемия	ЛПВП и ЛПОНП	ТГ и холестерин	Повышение уровня белка апоВ; повышение количества рецепторов к ЛПНП
III	Семейная дис-бета-липопротеинемия	ЛППП	ТГ и холестерин	Нарушение синтеза белка апоЕ2	
IV	Эндогенная гиперлипидемия	ЛПОНП	ТГ	Усиленное образование ЛПОНП и их замедленный распад	
V	Семейная гипертриглицеридемия	Хиломикроны и ЛПОНП	ТГ и холестерин	Усиленное образование ЛПОНП и пониженная ЛПЛ	

Первичные (генетические) и вторичные (образ жизни и другие) причины связаны с дислипидемией в разной степени. В большинстве случаев развитие болезни происходит вследствие сочетания первичных и вторичных причин. К первичным причинам относят мутации в одном или множестве генов, которые приводят к переизбытку или наоборот недостатку ТГ и Х-ЛПНП или ЛПВП [9].

Вторичные причины способствуют развитию дислипидемий у взрослых людей. В развитых странах главными вторичными причинами являются сидячий образ жизни и употребление в пищу большого количества продуктов, содержащих насыщенные жиры, холестерин и транс-жиры. К другим причинам относятся: сахарный диабет, злоупотребление алкоголем, хроническое заболевание почек, гипотиреоз, первичный билиарный цирроз печени и другие холестатические болезни печени, а также лекарства, такие, как тиазиды, β -блокаторы, ретиноиды, очень активные антиретровирусные препараты, циклоспорин, такролимус, эстроген и прогестины, и глюкокортикоиды [10]. К вторичным же причинам низкого уровня холестерина ЛПВП относят курение сигарет, анаболические стероиды, ВИЧ-инфекции [11] и нефротический синдром [12].

Показания для обследования с целью выявления дислипидемий

Скрининговую оценку факторов риска ССЗ, включая изучение липидного спектра, целесообразно проводить у мужчин в возрасте ≥ 40 лет и женщин в возрасте ≥ 50 лет или после наступления менопаузы, особенно при наличии других факторов риска. Кроме того, все пациенты с клиническими признаками атеросклероза или страдающие сахарным диабетом типа 2 независимо от возраста относятся к группе высокого риска; им рекомендуется провести исследование липидного профиля [13]. Пациенты с семейным анамнезом раннего развития ИБС также нуждаются в проведении скринингового обследования. Пациентов, страдающих артериальной гипертензией, следует обследовать для выявления сопутствующих метаболических расстройств и дислипидемий. Также следует обследовать пациентов с центральным ожирением, которое определяется для европейцев как увеличение окружности талии ≥ 94 см у мужчин (90 см для азиатских мужчин) и ≥ 80 см у женщин или увеличение индекса массы тела (ИМТ) ≥ 25 но < 30 кг/м² (избыточный вес) или ≥ 30 кг/м² (ожирение). Следует учитывать, что риск развития сердечно-сосудистой патологии значительно увеличивается по мере увеличения ИМТ, причем эта зависимость становится практически экспоненциальной при ИМТ > 27 кг/м² [14].

Хронические аутоиммунные воспалительные заболевания, такие как ревматоидный артрит, системная красная волчанка и псориаз, связаны с повышенным риском развития сердечно-сосудистой патологии. У пациентов, страдающих хронической болезнью почек (скорость клубочковой фильтрации (СКФ) < 60 мл/мин/1,73 м²), также повышен риск развития ССЗ, поэтому их необходимо обследовать для выявления дислипидемии. Также следует обращать внимание на клинические проявления наследственных дислипидемий, такие, как появление ксантом, ксантелазм или липоидной дуги роговицы, которые могут свидетельствовать о наличии серьезного нарушения липидного обмена, например, наследственной гиперхолестеринемии, которая является наиболее распространенным моногенным заболеванием, связанным с ранним развитием сердечно-сосудистой патологии. Проведение антиретровирусной терапии может вызывать прогрессирование атеросклероза. Детальное обследование для выявления дислипидемии также показано пациентам с заболеваниями периферических артерий и в случае обнаружения бляшек или увеличения толщины комплекса интима-медиа сонных артерий [14, 15].

Наконец, показано обследование потомков пациентов, страдающих выраженными нарушениями липидного обмена (наследственная гиперхолестеринемия, наследственная комбинированная гиперлипидемия или хиломикронемия), и направление их в специализированные клиники при обнаружении каких-либо признаков заболевания. Сходным образом рекомендуется обследование членов семьи пациентов с преждевременным развитием сердечно-сосудистых заболеваний [16].

Базовая оценка липидного спектра предполагает определение уровня ОХ, ТГ, Х-ЛПВП и липопротеинов низкой плотности, подсчитанного с использованием формулы Фридвальда [17] за исключением случаев, когда повышен уровень ТГ $> 4,5$ ммоль/л (> 400 мг/дл), или прямым методом. Оценка липидного спектра также предполагает определение уровня ХС, не связанного с ЛПВП (Х-не-ЛПВП), и соотношения ОХ/Х-ЛПВП. Формула Фридвальда при определении липидных параметров в ммоль/л выглядит следующим образом: Х-ЛПНП = ОХ-Х-ЛПВП-ТГ/2,2; при определении в мг/дл: Х-ЛПНП = ОХ-Х-ЛПВП-ТГ/5.

В качестве альтернативы можно использовать уровень апо В и соотношение апо В/апо А1, которые являются такими же хорошими маркерами риска, как традиционные параметры липидного обмена. Для выполнения указанных анализов подходит большинство коммерчески доступных стандартизированных методов определения липидного профиля [18]. Развитие

в последнее время методов «сухой химии» позволяет проводить исследование липидного спектра непосредственно в клинике. При проведении анализа с использованием данных методик следует пользоваться только сертифицированными и стандартизированными реактивами.

По возможности, забор образцов крови следует проводить после 12-часового голодания, однако это условие относится только к исследованию уровня триглицеридов, который необходим для дальнейшего определения уровня Х-ЛПНП с использованием формулы Фридвальда. Уровень ОХ, апо В, апо А1 и Х-ЛПВП можно определять после приема пищи. Исследование натошак также необходимо проводить в случае определения уровня глюкозы в рамках программы скринингового обследования [19].

У одного и того же человека уровень липидов и липопротеинов может в значительной степени различаться. Для общего холестерина диапазон колебаний составляет 5—10%, а для уровня ТГ >20%, особенно у пациентов с гипертриглицеридемией. В некоторой степени эти вариации объясняются использованием различных методик определения, а также факторами окружающей среды, диетой и степенью физической активности. Кроме того, имеют место сезонные колебания — уровень ОХ и Х-ЛПВП выше зимой [19].

Методики в диагностике дислипидемий

Согласно данным Совета Экспертов и Методических рекомендаций Всероссийского научного общества кардиологов, которые опубликованы в 2004 году, верхняя граница нормального уровня ХС в сыворотке крови в российской популяции составляет 6,2 ммоль/л. Эта цифра получена в результате проведенного в 1973—1976 гг. популяционного исследования в рамках международной программы специализированных клиник. Однако, с позиций профилактики атеросклероза и его осложнений, желательнее, чтобы уровень ОХ в сыворотке крови не превышал 5,0 ммоль/л; ТГ — 1,7 ммоль/л, Х-ЛПНП — 3,0 ммоль/л, а Х-ЛПВП был в пределах 1,0—1,89 ммоль/л.

Фенотипирование гиперлипопротеинемий (ГЛП)

Основу фенотипирования ГЛП исторически составляет метод электрофореза (ЭФ) на бумаге, позже бумагу заменили гелем ацетат целлюлозы и агарозы. При ЭФ липопротеинов все фракции, которые используют при фенотипировании ГЛП, образованы одной молекулой белка — апо В, двумя ее изоформами апо В-48 и апо В-100. Большинство клини-

ко-диагностических лабораторий в результате ЭФ липопротеинов выдают сведения о типе ГЛП, именно эти типы ГЛП (фенотипы) являются той основой, которая необходима клиницисту для формирования эффективной терапии [14, 20].

ГЛП типа I. При стоянии пробирки с плазмой крови на холоде хиломикроны (ХМ) всплывают на поверхность в виде сливкообразного слоя, в то время как нижележащая плазма остается прозрачной. Этот тест нередко применяют для дифференциальной диагностики I и V типов ГЛП. В последнем случае плазма остается мутной из-за повышенного содержания липопротеинов очень низкой плотности. Для I типа ГЛП характерно изолированное повышение ХМ (таблица). ХС и ТГ могут быть умеренно повышены. Первичной причиной ГЛП I типа обычно является дефицит ЛПЛ или дефицит ее кофактора аполипопротеина С. В этих случаях нозологическая форма заболевания проявляется либо как семейная гипертриглицеридемия I фенотипа, либо как семейная гиперхиломикронемия. Наследственный дефект активности постгепариновой ЛПЛ или апо С-II проявляется с детства. Патогенез — нарушение гидролиза ТГ в ХМ и ЛПОНП с накоплением преимущественно пре-л-ХМ; I тип ГЛП встречается редко и обычно не ассоциируется с развитием атеросклероза. Однако ремнанты, образующиеся в процессе гидролиза ХМ, могут при определенных обстоятельствах (дефект рецепторного связывания) быть атерогенными. I фенотип ГЛП иногда наблюдается у больных с системной красной волчанкой [21].

ГЛП типа IIa. IIa тип ГЛП характеризуется повышением концентрации Х-ЛПНП и ОХ, уровень ТГ находится в пределах нормы (таблица). Этот фенотип довольно распространен в популяции и тесно связан с развитием коронарного атеросклероза. Семейная гиперхолестеринемия (ГХС), полигенная ГХС, гипотиреоз — вот те нозологические формы, при которых чаще всего развивается ГЛП IIa типа. Патолофизиология IIa типа заключается в накоплении в крови постремнантных ЛПНП с развитием выраженной ГХС, уровни ТГ, ЛПОНП сохраняются в пределах нормальных значений, уровень Х-ЛПВП может быть существенно снижен [22].

ГЛП типа IIb. При IIb типе ГЛП повышены уровни ХС-ЛПНП и ХС-ЛПОНП (таб.). У лиц с IIb типом наблюдается комбинированная ГЛП, то есть повышены концентрации ОХ и ТГ. Этот тип ГЛП предполагает вероятность наличия различных врожденных дефектов в первичной структуре апопротеинов, эстераз и липид-переносящих

белков (полигенная патология); результатом многих единичных мутаций является нарушение гидролиза ТГ в ЛПОНП, содержащих олеиновую, линолеовую и линоленовую ЖК. В эти полигенные нарушения липолиза не включают дефекты первичной структуры каталитического домена постгепариновой ЛПЛ и ее кофермента апо С-II. IIb тип ГЛП наблюдается у больных с комбинированной семейной гиперлипидемией, сахарным диабетом (СД) 2 типа, нефротическим синдромом. Вероятность развития атеросклероза у носителей IIb типа ГЛП высокая [23].

ГЛП типа III. III тип ГЛП проявляется повышением липопротеинов промежуточной плотности (ЛПП) и, как следствие, ХС и ТГ (таблица). Это довольно редкий вид нарушений липидного обмена, ассоциирующийся с фенотипом E2/E2 апобелка E, при котором рецепторы печени хуже, нежели при других фенотипах апо E, связывают ЛППП, которые накапливаются в плазме крови. Более того, III фенотип клинически проявляется только при сочетании с нарушениями метаболизма, в частности, у больных с метаболическим синдромом и СД. При подозрении на III фенотип существенным подспорьем в диагностике является электрофорез сыровотки крови в агарозном геле. На электрофореграмме в этом случае выявляется характерная широкая бета полоса, отражающая высокое содержание в крови ЛППП. Носители III типа ГЛП, страдающие вышеуказанными метаболическими расстройствами, имеют высокий риск развития атеросклероза [24].

ГЛП типа IV. IV тип ГЛП проявляется повышенной концентрацией ЛПОНП и ТГ (таблица). Это распространенный тип дислипидемии, он встречается у 40% больных с ГЛП. IV фенотип может быть отражением семейной гипертриглицеридемии (ГТГ), а также частым проявлением вторичных нарушений липидного обмена. Природа моно-(поли)генного дефекта ГЛП IV типа остается неясной. В основе механизма развития лежит замедление гидролиза ТГ в составе прелигандных ЛПОНП (пре-л-ЛПОНП) при нормальной активности постгепариновой липопротеинлипазы (ЛПЛ) и нормальном рецепторном поглощении лигандных-ЛПОНП (л-ЛПОНП) клетками путем апо E/В-100 рецепторного эндоцитоза. Семейную ГТГ фенотипа IV характеризует умеренная гипертриглицеридемия, которая связана с накоплением в плазме крови пре-л-ЛПОНП. В комбинации с низкой концентрацией X-ЛПВП этот фенотип обладает высокой атерогенностью, в особенности у больных с СД [25].

ГЛП типа V. V тип ГЛП встречается редко. Он характеризуется одновременным повышением концентрации ХМ и ЛПОНП, ТГ и умеренным повышением концентрации ХС (таблица). Нозологическая форма заболевания — семейная ГЛП типа V. Этиология остается неясной, возможно, что в основе этого метаболического нарушения лежит врожденная недостаточность активности β -лецитин-холестерин-ацилтрансферазы [26]. Патогенез обусловлен нарушением синтеза прелигандных ХМ (пре-л-ХМ), пре-л-ЛПОНП и пре-л-ЛПНП моноеновых эфиров ХС. Следствием этого является накопление в плазме крови пре-л-ХМ, -ЛПОНП и -ЛПНП и нарушение поглощения клетками насыщенных и полиеновых ЖК. Обычно четкой связи между V типом ГЛП и развитием атеросклероза нет. Однако выраженная ГТГ, которая сопутствует этому типу, опасна развитием острого панкреатита [27].

Методы диагностики дислипидемии

Современными физико-химическими методами определения гетерогенности ЛПНП являются: капиллярный ЭФ, высокоэффективная жидкостная хроматография, зональное ультрацентрифугирование в вертикальном роторе и метод спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопии), которые дают идентичные результаты. Во фракции ЛПНП выявляют четыре субфракции — большие, средние, малые и очень малые ЛПНП. При этом процентное соотношение четырех субфракций ЛПНП, которое получают при применении каждого из методов, является разным; в силу этого положительная корреляция между относительными величинами отдельных субфракций ЛПНП находится на грани статистической значимости. Это зависит от того, что в каждом из методов разделение субфракций ЛПНП происходит на основании разных параметров:

- 1) при капиллярном ЭФ это заряд ЛПНП;
- 2) при жидкостной хроматографии в геле это размеры и параметры поверхности ЛПНП;
- 3) при зональном ультрацентрифугировании — это гидратированная плотность субфракций ЛПНП;
- 4) при ЯМР-спектроскопии это оценка липидов, связанных с апоВ-100.

Наиболее достоверными данными соотношения субфракций ЛПНП считаются те, которые получены методом ЯМР-спектроскопии при определении гетерогенности неполярных липидов. Именно липиды, которые связаны с молекулой апоВ-100 в каждой из субфракций ЛПНП, и определяют конформацию, пространственную, сферическую форму молекулы и формирование апоВ-100 лиганда. Разрешающая способность капиллярного ЭФ намного выше,

по сравнению с зональным ЭФ в геле агарозы. Используя его, удается разделить 4 субфракции ЛПВП, одну фракцию ЛПОНП и 4 субфракции ЛПНП, включая ЛППП; четвертая субфракция ЛПНП на ЭФ бывает не всегда. Метод дает возможность проследить за динамикой содержания субфракций ЛПВП в процессе гипополипидемической терапии семейной патологии или лечения вторичных форм ГЛП при заболеваниях печени и почек. Следует заметить, что при фенотипировании семейных форм ГЛП по Д. Фредрикссону, фракцию β -ЛП (ЛПВП) не используют [28]. Вместе с тем, определение субфракций ЛПВП позволяет дифференцировать редкие формы врожденной патологии, такие, как семейная недостаточность β -ЛХАТ, которая у человека и приматов нарушает поглощение клетками эссенциальных полиеновых жирных кислот, приводя к атеросклерозу, и семейная гиперальфапопротеинемия, для которой, наоборот, характерна резистентность к атеросклерозу. Методы капиллярного ЭФ, высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонках с гелем и метод ЯМР-спектроскопии можно использовать для целей фенотипирования семейных форм ГЛП [29].

Для диагностики специфических генетических дислипидемий может использоваться генотипирование аполипопротеина Е (апо Е) и генов, связанных с развитием наследственной гиперхолестеринемии. Апо Е представлен в трех изоформах (апо Е2, апо Е3 и апо Е4). Генотипирование апо Е в основном используется для диагностики дисбеталипопротеинемии (гомозиготность по апо Е2) и показано в случае наличия тяжелой комбинированной гиперлипидемии [30].

Алгоритмы диагностики семейной гиперхолестеринемии (СГХС)

Диагноз СГХС ставится на основании высокого уровня Х-ЛПНП, наличия ксантом, утолщения ахилловых сухожилий, ксантеллазм, и оценки по одному из диагностических алгоритмов. Диагноз гомозиготной формы СГХС весьма вероятен, если уровень Х-ЛПНП превышает 13 ммоль/л. Для постановки диагноза необходимо иметь как минимум два результата анализов, свидетельствующих о повышении уровня Х-ЛПНП. Отсутствие у пациента ксантом и утолщения ахилловых сухожилий более 1,3 см не исключает диагноз СГХС. Для подтверждения доминантного характера наследования необходимо собрать семейный анамнез и убедиться в том, что у ближайших родственников больного значительно повышен уровень Х-ЛПНП. Пациентам с СГХС должен быть предложен тест ДНК-диагностики для

подтверждения наследственного характера заболевания [31]. К настоящему времени в мире существуют три научных группы, разработавших рекомендации для больных с СГХС (US MedPedProgram, theSimonBroomRegisterGroup (UK), Датские диагностические критерии DutchLipidClinicNetwork).

ДНК диагностика СГХС. ДНК диагностика проводится с целью идентификации мутации генов, ответственных за развитие заболевания. К настоящему времени установлены мутации трех генов, которые вызывают СГХС (ген ЛПНП рецептора, ген апопротеина апо В-100 и ген фермента-конвертазы рецептора ЛПНП — PCSK9). ДНК-тест имеет высокую чувствительность (90—99,5%), но не всегда дает положительный ответ. Положительный тест ДНК диагностики не всегда подтверждает диагноз СГХС. По результатам датского исследования, у 40% пациентов с определенным диагнозом СГХС не удалось найти мутаций гена, вероятно, из-за большого числа их мутаций, определяющих развитие СГХС [31].

Гомозиготная форма семейной гиперхолестеринемии. Для этой формы заболевания характерны следующие клинические и лабораторные признаки [32]:

- раннее начало ИБС, иногда в возрасте 5—10 лет, но чаще во второй декаде жизни, без лечения пациенты погибают в возрасте 30—40 лет;
- выраженная ГХС с уровнем общего ХС, превышающим значения 15—20 ммоль/л;
- уровень ТГ, как правило, не превышает нормальных значений;
- клинические проявления: ИБС, атеросклероз корня аорты, атероматоз створок аортального клапана с развитием стеноза, туберозный и сухожильный ксантоматоз с локализацией на разгибательных поверхностях пястно-фаланговых, локтевых и коленных суставов, утолщение ахилловых сухожилий;
- наличие вышеперечисленных признаков в различной степени у родителей и ближайших родственников больного;

• терапия статинами, как правило, малоэффективна [33].

Гетерозиготная форма семейной гиперхолестеринемии. Для этой формы СГХС характерны следующие клинические и лабораторные признаки [32]:

- дебют ИБС в возрасте 30—40 лет;
- уровни ОХ в пределах значений 7—12 ммоль/л;
- уровень ТГ обычно не превышает нормальных значений, но в отдельных случаях может быть повышен (например, у лиц с сопутствующим СД и/или с ожирением);
- уровень ХС-ЛПВП нормальный или снижен;
- туберозные ксантомы, которые так же, как и при гомозиготной форме СГХС, локализуются на

разгибательных поверхностях пястно-фаланговых, локтевых, коленных суставов, в местах прикрепления коленных сухожилий к большеберцовой кости, утолщение ахилловых сухожилий, ксантелазмы, липоидная дуга роговицы. При наличии перечисленных признаков диагноз СГХС весьма вероятен. Для уточнения характера мутации генов ЛПНП рецептора или апоВ необходимо провести генетическую диагностику и также обследовать ближайших родственников больного, желательно с проведением у них генетического теста на СГХС [32].

Заключение

Таким образом, на сегодняшний день на вооружении врачей есть современные и высокоэффективные методы для дифференциальной диагностики дислипидемий. Для диагностики используют как биохимические (ультрацентрифугирование, электрофорез и др.), физические (ЯМР-спектроскопия), так и молекулярные (ДНК-тест) методики диагностики. Биохимические методики используют в основном для первичной диагностики дислипидемий, тогда как остальные методики нужны для постановки более точного диагноза. ДНК-диагностику полезно применять для лиц, имеющих родственников, у которых была диагностирована одна из наследственных форм дислипидемии (например, гиперхолестеринемия), чтобы, в случае положительного тестирования, можно было начать профилактику как можно раньше.

Дислипидемии важно диагностировать на ранних этапах, так как это патологическое состояние организма может привести к таким серьезным заболеваниям, как атеросклероз, а в дальнейшем и к ССЗ. Благодаря современным методикам диагностирование осуществляется эффективно и в короткие сроки [34].

References

1. Sobenin I.A., Karagodin V.P., Mel'nichenko A.A., Orekhov A.N. Cholesterol of circulating immune complexes as biomarker of atherosclerosis. *Patol Fiziol Eksper Ter.* 2012; (3): 99-103. (In Russian)
2. Feoktistov A.S., Gavrilin M.A., Karagodin V.P., Bobryshev Yu.V., Orekhov A.N. Promising therapeutic approaches to inhibition of atherogenic modification (desialylation) of low density lipoproteins. *Pathogenesis.* 2013; 11(2): 46-50.
3. Gofman J.W., Lindgren F.T., Elliott H. Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. *J Biol Chem.* 1949; 179(2): 973-9.
4. Rizzo M., Berneis K. Lipid triad or atherogenic lipoprotein phenotype: a role in cardiovascular prevention? *J Atheroscler Thromb.* 2005; 12(5): 237-9.
5. Chernova E.V., Sobenin I.A., Melnichenko A.A., Karagodin A.P., Orekhov A.N. Serum atherogenicity as a pathogenetic target for direct anti-atherosclerotic therapy. *Pathogenesis.* 2013; 11(2): 28-41.
6. Rached F.H., Chapman M.J., Kontush A. An overview of the new frontiers in the treatment of atherogenic dyslipidemias. *Clin Pharmacol Ther.* 2014; 96(1): 57-63.
7. Orekhov A.N., Mukhamedova N.M., Sviridiov D.D., Karagodin V.P., Melnichenko A.A., Myasoedova V.A. et al. Study of anti-inflammatory effect of high density lipoproteins. *Pathogenesis.* 2012; 10(2): 83-90. (In Russian)
8. Melnichenko A.A., Orekhova V.A., Sobenin I.A., Karagodin V.P., Orekhov A.N. Development of novel cell models for the evaluation of cholesterol efflux. *Pathogenesis.* 2013; 11(4): 39-48. (In Russian)
9. Ivanova M.M., Borodachev E.N., Sazonova M.A. Human pathologies associated with mutations of mitochondrial genome. *Patol Fiziol Eksper Ter.* 2012; (3): 115-22. (In Russian)
10. Tziomalos K., Athyros V.G., Karagiannis A., Mikhailidis D.P. Dyslipidemia as a risk factor for ischemic stroke. *Curr Top Med Chem.* 2009; 9(14): 1291-1297.
11. Bukrinsky M.L., Karagodin V.P., Orekhova V.A., Melnichenko A.A., Myasoedova V.A., Sobenin I.A. et al. Cholesterol homeostasis dependence on Nef expression in HIV-infected cells. *Pathogenesis.* 2011; 9(1): 34-7. (In Russian)
12. Ahmed S.M., Clasen M.E., Donnelly J.E. Management of dyslipidemia in adults. *Am Fam Physician.* 1998; 57(9): 2192-204.
13. Borodachev E.N., Sobenin I.A., Karagodin V.P., Bobrishev Y.V., Orekhov A.N. Multiple modified low density lipoprotein in diabetes mellitus. *Pathogenesis.* 2013; 11(4): 16-21. (In Russian)
14. Perk J., De Backer G., Gohlke H., Graham I., Reiner Z., Verschuren W.M., Albus C., et al. [European Guidelines on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts)]. *G Ital Cardiol (Rome).* 2013; 14(5): 328-92.
15. Temchenko A.V., Nikiforov N.G., Orekhova V.A., Melnichenko A.A., Karagodin V.H., Sobenin I.A. et al. Achievements in therapy of atherosclerosis. *Pathogenesis.* 2013; 11(2): 11-8.
16. Klose G., Laufs U., Mdrz W., Windler E. Familial hypercholesterolemia: developments in diagnosis and treatment. *DtschArztebl Int.* 2014; 111(31-32): 523-9.
17. Friedewald W.T., Levy R.I., Fredrickson D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972; 18(6): 499-502.
18. Di Angelantonio E., Sarwar N., Perry P., Kaptoge S., Ray K.K., Thompson A., et al. Emerging Risk Factors Collaboration. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA.* 2009; 302(18): 1993-2000.
19. Langsted A., Freiberg J.J., Nordestgaard B.G. Fasting and nonfasting lipid levels: influence of normal food intake on lipids, lipoproteins, apolipoproteins, and cardiovascular risk prediction. *Circulation.* 2008; 118(20): 2047-56.
20. Eaton C.B. Hyperlipidemia. *Prim Care.* 2005; 32(4): 1027-55.
21. Chokshi N., Blumenschein S.D., Ahmad Z., Garg A. Genotype-phenotype relationships in patients with type I hyperlipoproteinemia. *J Clin Lipidol.* 2014; 8(3): 287-95.
22. Bilen O., Pokharel Y., Ballantyne C.M. Genetic Testing in Hyperlipidemia. *Cardiol Clin.* 2015; 33(2): 267-75.

23. Vengoechea J., McKelvey K.D. Cholesterol and family history: when genetics matters. *J Ark Med Soc.* 2015; 111(9): 184-6.
24. Kei A., Miltiadous G., Bairaktari E., Hadjivassiliou M., Cariolou M., Elisaf M. Dysbetalipoproteinemia: Two cases report and a diagnostic algorithm. *World J Clin Cases.* 2015; 3(4): 371-6.
25. Lewis G.F., Xiao C., Hegele R.A. Hypertriglyceridemia in the genomic era: a new paradigm. *Endocr Rev.* 2015; 36(1): 131-47.
26. Fallat R.W., Glueck C.J. Familial and acquired type V hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis.* 1976; 23(1): 41-62.
27. Rehman H.U. The work-up for mixed hyperlipidemia: a case study. *J Fam Pract.* 2012; 61(3): 133-6.
28. Fredrickson D.S., Lees R.S. A system for phenotyping hyperlipoproteinemia. *Circulation.* 1965; 31: 321-7.
29. Watson K.E., Stocker E.H., Jacoby D.S., McCullough P.A. Advanced lipid testing: when, why, and in whom? *Rev Cardiovasc Med.* 2014; 15(4): 310-7; quiz 318-319.
30. Wierzbicki A.S., Humphries S.E., Minhas R.; Guideline Development Group. Familial hypercholesterolaemia: summary of NICE guidance. *BMJ.* 2008; 337: a1095.
31. Vogt A. The genetics of familial hypercholesterolemia and emerging therapies. *Appl Clin Genet.* 2015; 8: 27-36.
32. Pejic R.N. Familial hypercholesterolemia. *Ochsner J.* 2014; 14(4): 669-72.
33. Titov V.N. Statin-induced inhibition of cholesterol synthesis in liver and very low density lipoproteins. Statins, fatty acids and insulin resistance. *Pathogenesis.* 2013; 11(1): 18-26.
34. Aladinsky V.A., Nikiforov N.G., Orekhova V.A., Melnichenko A.A., Karagodin V.P., Sobenin I.A. et al. Direct antiatherosclerotic therapy: possible approaches, results of clinical trials. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2013; (4): 76-83. (In Russian)

Поступила 11.11.15

Сведения об авторах:

Карагодин Василий Петрович — доктор биол. наук, проф., вед. науч. сотр. лаб. ангиопатологии НИИОПП, e-mail: vрка@mail.ru

Орехов Александр Николаевич — доктор биол. наук, проф., рук. лаб. ангиопатологии НИИОПП, директор НИИ атеросклероза, e-mail: a.h.orexob@gmail.com

Батырова А.С., Баканов М.И., Сурков А.Н.

Состояние системы ремоделирования сосудов и ангиогенеза печени при хронических формах ее патологии

ФГАУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России, 119991, Москва, Ломоносовский просп., д. 2, стр.1

Обзор посвящен анализу работ в области патофизиологии сосудистого русла печени, мезентериальных сосудов, а также особенностей ангиогенеза при хронических заболеваниях печени (ХЗП). Делается заключение, что наиболее перспективным направлением является изучение растворимых рецепторов васкулоэндотелиального фактора роста, их роли в прогнозе и терапии заболеваний, протекающих с выраженными нарушениями ангиогенеза, в том числе и при ХЗП.

Ключевые слова: хронические заболевания печени; ангиогенез; синусоидальные эндотелиальные клетки печени; ангиоархитектоника печени; васкулоэндотелиальный фактор роста (VEGF)

Для цитирования: Батырова А.С., Баканов М.И., Сурков А.Н. Состояние системы ремоделирования сосудов и ангиогенеза печени при хронических формах ее патологии. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016; 60(1): 73–78.

Batyrova A.S., Bakanov M.I., Surkov A.N.

Current status of vascular remodeling and angiogenesis in chronic liver diseases

FSBI «SCCH» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 119991, Moscow, Russia

The review focuses on the analysis of researches on the pathophysiology of liver vascular bed, mesenteric vessels, as well as the characteristics of angiogenesis in CLD. The results of this review shows that one of the most important areas of research is soluble vascular endothelial growth factor receptors, disclosing their importance for prognosis and treatment of diseases that occur with severe disorders of angiogenesis, including in CLD.

Key words: chronic liver diseases (CLD); angiogenesis; liver sinusoidal endothelial cells; liver angioarchitecture; vascular endothelial growth factor (VEGF)

For citation: Batyrova A.S., Bakanov M.I., Surkov A.N. Current status of vascular remodeling and angiogenesis in chronic liver diseases. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2016; 60(1): 73–78. (in Russian)

For correspondence: Batyrova Anna, e-mail: annbatyrova@yandex.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Известно, что при хронических заболеваниях печени (ХЗП) во внутрипеченочной и периферической сосудистых сетях, а также в брыжеечном сосудистом русле происходят значительные изменения, приводящие к повышению внутрипеченочной сосудистой резистентности и портальной гипертензии, при этом резистентность печеночной артерии снижена. Повреждение печени приводит к нарушению функции эндотелия, при котором эндотелиальные клетки синусоидов печени (СЭКП) снижают продукцию вазодилататоров, например, NO, что сопровождается повышением синтеза вазоконстрикторов (эндотелина-I, ангиотензина-II) другими клетками синусоидов. В брыжеечных сосудистых сетях происходит вазодилатация за счет снижения синтеза вазоконстрикторов,

усиления фосфорилирования эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), активации и синтеза NO, повышения экспрессии ангиогенных факторов: васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF), прежде всего VEGF-A, тромбоцитарного фактора роста (PDGF), плацентарного фактора роста (PLGF) [1]. Это приводит к снижению сосудистой резистентности, артериальной вазодилатации, истончению стенки артерий, снижению реакции сосудов на вазоконстрикторы и усилению кровотока в воротной вене. При истончении артериальной стенки снижается ее сократительная способность, что в дальнейшем может способствовать повышению проницаемости, развитию отеков и асцита [1, 2]. В качестве одной из гипотез, объясняющих клеточные и молекулярные механизмы

Для корреспонденции: Батырова Анна Сергеевна, врач клинической лабораторной диагностики отделения инструментальной и лабораторной диагностики Консультативно-диагностического центра ФГБУ НИЦЗД Минздрава России, e-mail: annbatyrova@yandex.ru

истончения сосудистой стенки рассматривают усиленный апоптоз гладкомышечных клеток брыжеечных артерий [3].

В периферических сосудистых сетях повышенная активность eNOS и соответственно усиленная продукция NO, как правило, приводят к снижению сосудистой резистентности, падению системного артериального давления, гипердинамическому состоянию кровотока, что характерно для пациентов с циррозом печени (ЦП) любой этиологии [1].

Следует также отметить, что печеночные сосудистые клетки, такие, как СЭКП и перицитоподобные печеночные стеллатные клетки (ПСК-клетки ИТО) тесно связаны друг с другом и имеют паракринное и аутокринное влияние друг на друга и на самих себя. Образцовым примером является паракринное влияние NO на гладкомышечные клетки и стеллатные клетки. В данном случае источниками NO являются СЭКП [1]. По сравнению с другими эндотелиальными клетками печени и других органов фенотип СЭКП по-своему разнообразен [4]. Возможно, одним из самых уникальных особенностей фенотипа СЭКП является их организация по типу решетчатой пластинки и наличие в них фенестр, функция которых до сих пор не выяснена. Считается, что они облегчают о транспорт макромолекул из синусоидального просвета в пространство Дриссе, обеспечивая доступ этих молекул к гепатоцитам. Кроме того, *in vivo* потеря СЭКП базальной мембраны способствует в дальнейшем усиленному транспорту макромолекул [5, 6].

Недавний инновационный структурный анализ СЭКП показал, что формирование фенестр может регулироваться микродоменами липидного бислоя клеточных мембран, обогащенных холестерином и сфинголипидами [7]. Интересно, что распределение фенестр находится в обратной зависимости от регионов данных микродоменов. Последние могут служить платформой для многих мембранных белков, например, кавеолина-1. Имеются сведения о том, что усиление взаимодействия кавеолина-1 с eNOS снижает активность данного фермента. При этом, соответственно, снижается производство NO СЭКП, а чувствительность данных клеток к эндогенным вазоконстрикторам, таким как эндотелин, норадреналин, ангиотензин II, вазопрессин, лейкотриен, тромбоксан A₂, повышается. Кроме того, стимуляция эндотелином-1 рецепторов киназ, сопряженных с G-белками класса 2, приводит к ингибированию фосфорилирования протеинкиназой B (Akt) и гипопродукции NO [8].

При изучении клеточных молекулярных сигнальных путей, приводящих к нарушению образования фенестр, выявлено [9], что длительное пребывание VEGF на поверхности СЭКП повышает их формирование за счет существенного снижения количества

регионов микродоменов данного фактора в поддержании фенестр. Авторы также показали, что сниженное образование фенестр может быть связано с повышенными концентрациями кавеолина-1, которые экспрессируются СЭКП при возникновении фиброза [9]. Регуляция фенотипа СЭКП, в основном, происходит за счет растворимых факторов (например, факторов роста) или механического воздействия («напряжение сдвига»). Резюмируя вышесказанное, можно сделать вывод о том, что VEGF является самой важной молекулой, участвующей в формировании фенестр, определяя их количество в СЭКП. В эксперименте с клеточными культурами удаление данного фактора из питательной среды приводило к потере фенестр, а повторное внесение VEGF в среду — к их восстановлению [10, 11]. Помимо VEGF, существуют и другие факторы роста, регулирующие фенотип СЭКП, а именно: активаторы тирозинкиназного рецептора, ангиопоэтины, эфрины и факторы роста фибробластов [12]. Наиболее выраженный эффект так называемого «напряжения сдвига» проявляется в виде модуляции активности eNOS в СЭКП и высвобождения NO, что регулирует поток крови и сосудистый тонус в синусоидах [13]. Таким образом, разнообразные изменения фенотипов клеток или изменения в сигнальных путях могут приводить к портальной гипертензии, что объясняет их роль в печеночном фиброгенезе [1].

Соседние по отношению к СЭКП клетки также способны изменять их фенотип. Например, в эксперименте *in vitro* было показано, что обработка клеток печени насыщенными свободными жирными кислотами, которые в данном исследовании имитировали накопление липидов при стеатозе, вызывает высвобождение из них микровезикул, обладающих проангиогенной активностью, способностью к миграции и формированию полости сосуда эндотелиальными клетками [14]. Хотя на сегодняшний день эффекты микровезикул, выделенных из гепатоцитов, точно не определены, данный пример позволяет предположить, что взаимодействие между гепатоцитом и СЭКП индуцирует ангиогенез [1].

По-видимому, процесс ремоделирования синусоидов, включающий сложные взаимодействия печеночных клеток, также способствует повышению внутрипеченочной сосудистой резистентности. Например, при циррозе печени (ЦП) активация печеночных стеллатных клеток (ПСК) приводит к накоплению белков внеклеточного матрикса и таким образом создается сплошная базальная мембрана вокруг синусоидов. В свою очередь, такое интенсивное «обертывание» синусоидов активированными ПСК способствует как раз повышению внутрипеченочной сосудистой резистентности [15]. К тому же при повреждении пе-

чени сниженная продукция NO СЭКП проявляется стимуляцией клеточной пролиферации, положительной регуляцией различных артериальных поверхностных маркеров. Это способствует снижению образования фенестр в СЭКП, что в результате приводит к новой дифференцировке клеток, капилляризации микрососудов печени. Данные процессы являются ранними признаками внутривисцеральной портальной гипертензии [1, 16].

Ангиогенез — сложный физиологический процесс образования новых кровеносных сосудов из ранее существующих. Он осуществляется посредством активации эндотелиальных клеток, экспрессии в них протеаз, разрушения внеклеточного матрикса, пролиферации, миграции и образования ими первичных высокопроницаемых сосудистых структур, которые после стабилизации и «взросления» за счет привлечения перититов и гладкомышечных клеток, трансформируются в трехмерную сосудистую сеть [17]. В настоящее время ангиогенез печени рассматривают в контексте различных воспалительных, фиброзных и ишемических состояний, хотя ранее его связывали только с опухолевыми процессами [1].

Основным индуктором ангиогенеза как в физиологических условиях, так и при различных патологических состояниях является гипоксия. Клетки реагируют на недостаток кислорода несколькими механизмами, в том числе накоплением факторов, индуцированных гипоксией (HIFs), что стимулирует экспрессию ангиогенных факторов роста. Семейство HIFs включает три α -субъединицы, которые сопряжены с общей β -субъединицей (HIF-1 β). Если HIF-1 α присутствует повсеместно, то HIF-2 α обнаружен в ограниченном типе клеток, в частности, в сосудистых эндотелиоцитах, гепатоцитах, пневмоцитах II типа и макрофагах. Роль HIF-3 α в гипоксических состояниях пока изучена недостаточно [8].

NADPH-оксидаза важный медиатор ангиогенной сигнализации. Повышенная ее экспрессия в результате фосфорилирования цитозольного компонента p47^{phox} приводит к увеличению формирования реактивных форм кислорода (ROS), что способствует индукции HIF-1 α , активации VEGFR и трансактивации рецепторов эндотелиальных факторов роста (EGF) [18]. Известно, что связывание VEGF-A с VEGFR-2 и повышение проницаемости сосудов посредством NO запускают процессы ангиогенеза и васкулогенеза.

В отличие от VEGF, плацентарный фактор роста (PLGF), соединенный с VEGFR-1, индуцирует исключительно патологический ангиогенез, прямо или опосредованно влияя на многочисленные типы клеток, в том числе на эндотелиоциты. Кроме того, предполагают, что, нарушая связь VEGF с VEGFR-1, PLGF

делает VEGF более доступным к соединению с VEGFR-2. Поскольку PLGF и VEGF индуцируют фосфорилирование тирозиновых остатков VEGFR-1, можно предположить, что именно через него они передают определенные ангиогенные сигналы [8].

В ряде работ было показано, что при ХЗП, в частности, при хронических вирусных гепатитах (ХВГ) и ЦП вирусной этиологии, имеются признаки повреждения и дисфункции эндотелия, выраженность которых зависит от тяжести патологического процесса [19, 20]. Было обнаружено [21], что тромбомодулин, являющийся маркером повреждения эндотелиоцитов у пациентов с ХВГ С, повышается в зависимости от интенсивности прогрессирования фиброза печени. Было также показано, что концентрация тромбомодулина в сыворотке крови положительно коррелирует с фактором Виллебранда, что может свидетельствовать о сочетанном влиянии этих показателей на выраженность дисфункции эндотелия, возникающей в результате воспалительных изменений в печени. Это согласуется с данными о том, что тромбомодулин и фактор Виллебранда могут быть предикторами нарушений функции эндотелиальных клеток при повреждении печени, вызываемом вирусами гепатита В и С у детей [22].

Таким образом, важную роль в повышении печеночного сосудистого сопротивления портальному кровотоку играет дисфункция эндотелия и нарушение паракринного взаимодействия между активированными ПСК и СЭКП, а также ремоделирование и капилляризация синусоидов. При этом развитие внутривисцерального ангиогенеза можно рассматривать как компенсаторный механизм, направленный на декомпрессию портальной системы. Вместе с тем, новообразованные сосуды, несущие кровь в обход синусоидов, не способны обеспечить кислородом и питательными веществами ткани печени, что приводит к прогрессированию заболевания [1].

Портосистемный коллатеральный кровоток развивается из ранее существующих сосудов в ответ на повышение портального давления [23]. В первую очередь изменения затрагивают кишечную микроциркуляцию, и лишь затем артерии внутренних органов [24]. Получены данные о возможности образования в этих сосудистых сетях различных ангиогенных факторов (VEGF и PLGF), стимулирующих ангиогенез и способствующих формированию портосистемных коллатералей, функция которых заключается в снижении давления в портальной системе. Однако в большинстве случаев давление в системе портальных вен остается повышенным из-за усиленного тока крови в сосудах внутренних органов, что вызвано вазодилатацией. Кроме того, портосистемные коллатера-

ли вызывают такие серьезные осложнения как варикозное расширение вен и/или печеночную энцефалопатию. Экспериментальные исследования на моделях с портальной гипертензией и ЦП показали, что портосистемные коллатерали могут быть уменьшены в количественном плане с помощью различных подходов, включающих ингибирование самого VEGF антителами к VEGFR2 или комбинацией антител к VEGF (рапамицин) и тромбоцитарному фактору роста PDGF (гливек), а также ингибирование PLGF [25], апелина [26], сорафениба [27, 28] и канабиноидного сигналинга [29]. Следует отметить, что сокращение сосудистых коллатералей незначительно изменяет портальный кровоток, поэтому не всегда приводит к снижению тонуса сосудов до нормального уровня [30].

В ряде работ были продемонстрированы изменения в эндотелиальных клетках с формированием характерных капиллярных структур в воспаленных портальных трактах при ХВГ [31—33]. Предполагают, что данный процесс оказывает положительное влияние на тканевое восстановление и регенерацию после повреждения печени [32]. К настоящему времени молекулярные механизмы ангиогенеза при этих заболеваниях до конца не выяснены, но по накопленным данным зарубежной литературы ангиогенез играет важную роль в прогрессировании ХВГ [34]. Есть предположение, что ангиогенез представляет собой фактор риска развития гепатоцеллюлярной карциномы при ХВГ С [35]. Однако в экспериментах *in vitro* на клетках больных людей и на животных было показано, что многие из молекул, участвующих в ангиогенном ответе, избыточно экспрессируются в печени. Это свидетельствует об их потенциальной роли в развитии ангиогенеза, хотя причинно-следственная связь во всех случаях не была продемонстрирована. Локальная продукция NO, вызванная чрезмерной экспрессией eNOS в печени у пациентов с ХВГ В и С, может участвовать в ангиогенном ответе, вызывая расширение кровеносных сосудов и, скорее всего, вызывая постепенное развитие неоангиогенеза [32, 36, 37]. VEGF и фактор роста гепатоцитов (HGF), экспрессия которых увеличивается при ХВГ, могут способствовать усилению сосудистой проницаемости [31]. Эффекты HGF заключаются в снижении и перераспределении VE-кадгерина, участвующего в межклеточных контактах, β -катенина и плакоглобина, связывающих молекулы VE-кадгерина и актина цитоскелета клетки) в эндотелиальных клетках. Кроме того, вирусные белки также могут играть определенную роль в индукции нарушения межэндотелиальных контактов через механизмы, в которых принимают участие Src-киназы, молекулы, требующиеся для сосудистой проницаемости во время ангиогенеза.

У пациентов с ХВГ связь между эндотелиальными клетками и внеклеточным матриксом может быть изменена. Наличие интегрина $\alpha v \beta 3$ указывает на повышенную тканевую экспрессию при ХВГ С. Интересно, что когда HGF индуцирует эндотелиальные клетки к миграции, $\alpha v \beta 3$ интегрин начинает, скапливается у переднего края клеток. Скопление данных молекул можно расценивать как «зону сцепления», необходимую для «напряжения сдвига» клетки [31].

Некоторые авторы сообщают, что у взрослых пациентов с аутоиммунным гепатитом (АИГ), первичным билиарным циррозом (ПБЦ), первичным склерозирующим холангитом (ПСХ) в печени отмечается сокращение перибиллярного капиллярного сплетения [38, 39]. Данный факт обусловлен деструкцией сосудистых структур под действием аутоиммунных механизмов, которые затрагивают изменения и в желчных протоках при ПБЦ и ПСХ. При этом имеются данные о возникновении ангиогенеза при ПБЦ и АИГ. В данном случае ангиогенез может возникнуть на поздней стадии заболевания в ответ на гипоксию, вызванную истощением существующих сосудов, хотя точная кинетика процесса до настоящего времени не уточнена [38]. АИГ является хроническим прогрессирующим заболеванием печени, характеризующимся серологическими изменениями (гипергаммаглобулинемией, положительными титрами печеночных специфических аутоантител) и наличием гистологического сходства с гепатитами другой этиологии. Тубулярная структура сосудов, отражающая формирование новых сосудов, наблюдается в воспаленных портальных трактах у пациентов с АИГ [40]. Так же, как и при ПБЦ и ХГС, положительная регуляция индуцированной eNOS при АИГ приводит к усилению продукции NO. Это может указывать на участие данного процесса в ангиогенезе [41]. Тем не менее, информация о механизмах ангиогенеза при АИГ все еще очень скудна.

Сведений о лабораторных данных, которые свидетельствовали бы о дисфункции эндотелия у детей с болезнями накопления (гликогеновая болезнь, болезнь Вильсона—Коновалова, наследственный гемохроматоз), протекающими с поражением печени, а также при АИГ, ПСХ в доступной литературе нами не обнаружено.

Представленные в обзоре сведения свидетельствуют о необходимости и целесообразности дальнейших углубленных исследований в области изучения процессов ремоделирования сосудов и ангиогенеза при ХЗП, поскольку это могло бы способствовать разработке новых подходов к лечению данных заболеваний и профилактике осложнений. Раннее выявление нарушений ангиоархитектоники печени позволит своевременно определить степень прогрессирования заболе-

ваний печени, а ангиогенные молекулы могут быть использованы в качестве потенциальных маркеров, реагирующих на терапевтические агенты.

References

- Iwakiri Y., Shah V., Rockey D.C. Vascular pathobiology in chronic liver disease and cirrhosis — Current status and future directions. *J. Hepatol.* 2014; 61 (4): 912-24.
- Fernandez-Varo G., Morales-Ruiz M., Ros J., Tugues S., Munoz-Luque J., Casals G. et al. Impaired extracellular matrix degradation in aortic vessels of cirrhotic rats. *J. Hepatol.* 2007; 46 (3): 440-6.
- Tashiro K., Utsumi T., Chen T., Iwakiri Y. EMMPRIN/CD147 induction in the adventitia of superior mesenteric arteries facilitates thinning of arteries in cirrhotic rats with portal hypertension. *Hepatology.* 2012; 56: 305A.
- Wisse E., De Zanger R.B., Jacobs R., McCuskey R.S. Scanning electron microscope observations on the structure of portal veins, sinusoids and central veins in rat liver. *Scanning Microsc.* 1983; Pt 3:1441-52.
- Iwakiri Y., Grisham M., Shah V. Vascular biology and pathobiology of the liver: report of a single-topic symposium. *Hepatology.* 2008; 47 (5): 1754-63.
- Bhunchet E., Fujieda K. Capillarization and venularization of hepatic sinusoids in porcine serum-induced rat liver fibrosis: a mechanism to maintain liver blood flow. *Hepatology.* 1993; 18 (6):1450-8.
- Svistounov D, Warren A., McNerney G. P., Owen D.M., Zencak D., Zykova S.N. et al. The relationship between fenestrations, sieve plates and rafts in liver sinusoidal endothelial cells. *PLoS One.* 2012; 7 (9): e46134
- Garbuzenko D.V. Morphofunctional rearrangement of the hepatic vasculature in the pathogenesis of portal hypertension in liver cirrhosis *Terapevticheskiy arkhiv.* 2014; 86 (2): 90-5. (in Russian)
- Shah V., Toruner M., Haddad F., Cadelina G., Papatropoulos A., Choo K. et al. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology.* 1999; 117: 1222-8.
- Funyu J., Mochida S., Inao M., Matsui A., Fujiwara K. VEGF can act as vascular permeability factor in the hepatic sinusoids through upregulation of porosity of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 280: 481-5.
- May D., Djonov V., Zamir G., Bala M., Safadi R., Sklair-Levy M. et al. A transgenic model for conditional induction and rescue of portal hypertension reveals a role of VEGF-mediated regulation of sinusoidal fenestrations. *P.LoS One.* 2011; 6:e 21478.
- Zou L., Cao S., Kang N., Huebert R. C., Shah V. H. Fibronectin induces endothelial cell migration through beta1 integrin and Src-dependent phosphorylation of fibroblast growth factor receptor-1 at tyrosines. 653/654 and 766. *J. Biol. Chem.* 2012; 287: 7190-202.
- Shah V., Haddad F. G., Garcia-Cardena G., Frangos J.A., Mennone A., Groszmann R. J. et al. Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. *J. Clin Invest.* 1997; 100: 2923-30.
- Povero D., Eguchi A., Niesman I. R., Andronikou N., de Mollerat du Jeu X, Mulya A. et al. Lipid-induced toxicity stimulates hepatocytes to release angiogenic micro-particles that require Vanin-1 for uptake by endothelial cells. *Science signaling.* 2013; 6(296): ra88.
- Thabut D, Shah V. Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: new targets for the treatment of portal hypertension? *J. Hepatol* 2010; 53: 976-80.
- De Spiegelaere W, Cornillie P, Van den Broeck W, Plendl J, Bahramsoltani M. Angiopoietins differentially influence in vitro angiogenesis by endothelial cells of different origin. *Clin Hemorheol. Microcirc.* 2011; 48: 15-27.
- Folkman J. Angiogenesis: in organizing principle for drug discovery? *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2007; 6(4): 273-86.
- Brandes R.P., Miller F.J., Beer S. et al. Vascular NADPH oxidase subunit p47phox is involved in redox-mediated gene expression. *Free Radic. Biol. Med.* 2002; 32(11): 1116-22.
- Shchekotova A.P. *Clinical and laboratory parameters and endothelial dysfunction in liver diseases and their diagnostic, prognostic significance and the possibility of using in evaluation the effectiveness of therapy [Kliniko-laboratornye pokazateli i endotelial'naya disfunktsiya pri zabolevaniyakh pecheni, ih diagnosticheskaja, prognosticheskaja znachimost' i vozmozhnosti ispol'zovanija dlja ocenki jeffektivnosti terapii]: diss.* Perm; 2012. (in Russian)
- Bulatova I.A., Shchekotova A.P., Tret'iakova Ju.I. Endothelial dysfunction in chronic diffuse liver disease [Disfunkcii jendotelija pri hronicheskikh diffuznyh zabolevaniyakh pecheni]. *Kazanskiy medicinskiy zhurnal.* 2009; 90(1): 46-8. (in Russian)
- Osada M., Kaneko M., Sakamoto M., Endoh M., Takigawa K., Suzuki-Inoue K. et al. Causes of thrombocytopenia in chronic hepatitis C viral infections. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis.* 2013; 18 (3): 272-280.
- Kulwas A., Szaflarska-Szczepanik A., Czerwionka-Szaflarska M, Kotschy M. Von Willebrand factor and thrombomodulin as markers of endothelial cell functions in children with chronic viral hepatitis. *Med. Wieku. Rozwoj.* 2004; 8(1):107-114.
- Sieber C.C., Sumanovski L.T., Stumm M., van der Kooij M., Bategay E. In vivo angiogenesis in normal and portal hypertensive rats: role of basic fibroblast growth factor and nitric oxide. *J Hepatol.* 2001; 34: 644-650.
- Abraldes J.G., Iwakiri Y., Loureiro-Silva M., Haq O., Sessa W.C., Groszmann R.J.. Mild increases in portal pressure upregulate vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase in the intestinal microcirculatory bed, leading to a hyperdynamic state. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 290: G980-G987.
- Van Steenkiste C., Trachet B., Casteleyn C., van Loo D., Van Hoorebeke L., Segers P. et al. Vascular corrosion casting: analyzing wall shear stress in the portal vein and vascular abnormalities in portal hypertensive and cirrhotic rodents. *Lab. Invest.* 2010; 90: 1558-72.
- Tiani C., Garcia-Pras E., Mejias M., de Gottardi A., Berzigotti A., Bosch J. et al. Apelin signaling modulates splanchnic angiogenesis and portosystemic collateral vessel formation in rats with portal hypertension. *J Hepatol.* 2009; 50: 296-305.
- Mejias M., Garcia-Pras E., Tiani C., Miquel R., Bosch J., Fernandez M. Beneficial effects of sorafenib on splanchnic, intrahepatic, and portocollateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats. *Hepatology.* 2009; 49:1245-1256.
- Reiberger T., Angermayr B., Schwabl P., Rohr-Udillova N., Mitterhauser M., Gangl A. et al. Sorafenib attenuates

tes the portal hypertensive syndrome in partial portal vein ligated rats. *J Hepatol.* 2009; 51: 865-873.

29. Huang HC, Wang SS, Hsin IF, Chang CC, Lee FY, Lin HC, et al. Cannabinoid receptor 2 agonist ameliorates mesenteric angiogenesis and portosystemic collaterals in cirrhotic rats. *Hepatology.* 2012; 56: 248-258.

30. Van Steenkiste C, Ribera J, Geerts A, Pauta M, Tugues S, Casteleyn C. et al. Inhibition of placental growth factor activity reduces the severity of fibrosis, inflammation, and portal hypertension in cirrhotic mice. *Hepatology.* 2011; 5: 1629-40.

31. Medina J., Arroyo A.G., Sanchez-Madrid F., Moreno-Otero R. Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. *Hepatology.* 2004; 39(5): 1185-95.

32. Garcia-Monzon C., Sanchez-Madrid F., Garcia-Buey L., Garcia-Arroyo A., Garcia-Sanchez A., Moreno-Otero R. Vascular adhesion molecule expression in viral chronic hepatitis: evidence of neoangiogenesis in portal tracts. *Gastroenterology.* 1995; 108: 231-241.

33. Mazzanti R., Messerini L., Monsacchi L., Buzzelli G., Zignego A., Foschi M. et al. CVH induced by hepatitis C but not hepatitis B virus infection correlates with increased liver angiogenesis. *Hepatology.* 1997; 25: 229-234.

34. Elpek G.O. Angiogenesis and liver fibrosis. *World J Hepatol.* 2015; 7(3): 377-91.

35. Ohmori S, Shiraki K, Sugimoto K, Sakai T, Fujikawa K, Wagayama H, et al. High expression of CD34-positive sinusoidal endothelial cells is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with HCV-associated chronic liver diseases. *Hum Pathol.* 2001; 32: 1363-70.

36. Majano P.L., Garcia-Monzon C., Lopez-Cabrera M., Lara-Pezzi E., Fernandez-Ruiz E., Garcia-Iglesias C. et al. Inducible nitric oxide synthase expression in chronic viral hepatitis. Evidence for a virus-induced gene upregulation. *J. Clin. Invest.* 1998; 101: 1343-1352.

37. Majano P., Lara-Pezzi E., Lopez-Cabrera M., Apolinario A., Moreno-Otero R., Garcia-Monzon C. Hepatitis B virus X protein transactivates inducible nitric oxide synthase gene promoter through the proximal nuclear factor kappaB-binding site: evidence that cytoplasmic location of X protein is essential for gene transactivation. *Hepatology.* 2001; 34: 1218 -24.

38. Washington K., Clavien P., Killenberg P. Peribiliary vascular plexus in primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis. *Hum Pathol.* 1997; 28: 791-795.

39. Matsunaga Y., Terada T. Peribiliary capillary plexus around interlobular bile ducts in various chronic liver diseases: an immunohistochemical and morphometric study. *Pathol. Int.* 1999; 49: 869-73.

40. Medina J., Garcia-Buey L., Moreno-Otero R. Review article: immunopathogenetic and therapeutic aspects of autoimmune hepatitis. *Aliment Pharmacol. Ther.* 2003; 17: 1-16.

41. Sanz-Cameno P., Medina J., Garcia-Buey L., Garcia-Sanchez A., Borque M., Martin-Vilchez S. et al. Enhanced intrahepatic inducible nitric oxide synthase expression and nitrotyrosine accumulation in primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* 2002; 37: 723-29.

Поступила 11.11.15

Сведения об авторах:

Баканов Михаил Иванович, профессор, д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории нейробиологии и фундаментальных основ развития мозга лабораторного отдела НИИ педиатрии ФГБУ НЦЗД Минздрава России

Сурков Андрей Николаевич, к.м.н., врач-гастроэнтеролог консультативного отделения Консультативно-диагностического центра ФГБУ НЦЗД Минздрава России, e-mail: surkov@nczd.ru

Арушанян Э.Б., Щетинин Е.В.

Мелатонин как универсальный модулятор любых патологических процессов

Бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования
«Ставропольский государственный медицинский университет», 355017, Ставрополь, ул. Мира, д. 310

В обзоре представлены собственные и литературные доказательства наличия у мелатонина, продуцируемого клетками эпифиза и периферических тканей, способности универсально модулировать и ограничивать любые патологические процессы в головном мозге и внутренних органах. Рассмотрены клеточные и системные механизмы его защитных, модуляторных свойств.

Ключевые слова: мелатонин, патологические процессы, универсальная защита

Для цитирования: Арушанян Э.Б., Щетинин Е.В. Мелатонин как универсальный модулятор любых патологических процессов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(1): 79–88

Arushanian E.B., Schetinin E.V.

Melatonin as a universal modulator of any pathological processes

Stavropol State Medical University, Stavropol, 355017, Mira str., 310, Russia

In paper reviewed own and numerous literary data about of universal modulated and limited influences of melatonin, which produced by pineal gland and peripheral tissues cells, on any pathological processes in the cerebral brain and internal organs. Cellular and systemic mechanisms of its protective and modulated properties were observed.

Keywords: melatonin; pathological processe; universal protection

For citation: Arushanian E.B., Schetinin E.V. Melatonin as a universal modulator of any pathological processes. *Patologicheskaya fiziologiya I eksperimental'naya terapiya.* 2016 ; 60(1): 79–88. (in Russian)

For correspondence: Arushanian E.B., e-mail: eduard.arush@mail.ru

Происхождение и биологическая (адаптогенная) роль МТ

Мелатонин (МТ) был выделен из эпифиза животных лишь в середине XX в. Позднее он был идентифицирован в качестве основного специфического гормона. В настоящее время известны процессы, которые определяют широкий диапазон физиологической активности МТ. Эти сведения уже неоднократно освещались в серии обзорных публикаций [1, 6, 54], позволяющих очень кратко выделить несколько основных положений.

Синтез МТ, имеющего индольную структуру, происходит в несколько этапов в секреторных клетках эпифиза пинеалоцитах. Начальным звеном является триптофан, который через серотонин и N-ацетилсеротонин превращается в конечный гормон. Образовавшийся МТ секретируется в ликвор и с током крови разносится по всему организму. В различных структурах головного мозга и в периферических тканях его эффекты реализуются посредством специфических

рецепторов (преимущественно типа МТ1 и МТ2). Образование эпифизарного МТ вне зависимости от видовых особенностей животных максимально выражено в тёмный период суток. Это обстоятельство позволило считать эпифиз важной хронотропной железой, участвующей в организации ночного сна и циркадианных колебаний многих физиологических функций. В результате за МТ закрепилась репутация естественного гипногенного агента и организатора биологических ритмов — хронобиотика со свойствами универсального адаптогена. Эти представления были сформулированы на первоначальном этапе изучения физиологии эпифиза и секретируемых им биологически активных соединений. Уже в 70-е годы иммуногистохимически установлено наряду с эпифизарным, существование собственного МТ во многих периферических клетках и тканях (сетчатке глаза, органах желудочно-кишечного тракта, клетках крови и др.). Как и в эпифизе, такой МТ проходит аналогичные этапы синтеза при участии тех же ферментов.

Для корреспонденции: Арушанян Эдуард Бениаминович, зав. каф. фармакологии Ставропольского медицинского университета, заслуженный деятель науки РФ, доктор мед. наук, проф., e-mail: eduard.arush@mail.ru

Общее количество МТ в ткани секретирующего его органа в десятки раз может превосходить уровень плазменного гормона эпифизарного происхождения. Необычайно широкое распространение в организме позволило высказать предположение, согласно которому периферический МТ наравне с центральным (эпифизарным) может играть ключевую роль в качестве паракрынной сигнальной молекулы для региональной координации клеточных функций [28, 37, 44]. Циркулирующий в крови МТ за счёт своей высокой липофильности, действуя как типичный гормон, достигает отдаленных клеток-мишеней и обеспечивает их универсальную защиту от любого патогенного фактора.

Защитное влияние МТ на проявления органных патологий

Функциональные и органические поражения головного мозга

Помимо рано установленной способности МТ ослаблять поведенческие и ЭЭГ проявления инсомнии, показано его нормализующее влияние на психоэмоциональное состояние животных и человека. В частности, как при однократном, так и особенно при хроническом введении крысам достаточно низких доз МТ (0,1—1 мг/кг) с помощью обычных поведенческих тестов («открытое поле», приподнятый крестовидный или радиальный лабиринты и др.) выявлено угнетающее действие гормонального препарата на проявления страха и тревожности у животных. Чётко ограничивалась выраженность поведенческих нарушений, обусловленных различными экзогенными и эндогенными стрессорами, а у людей отмечено заметное снижение чувства тревоги. По этому критерию МТ может быть отнесён к разряду антистрессорных средств, подобных анксиолитикам бензодиазепинового ряда, будучи к тому же весьма близок им по спектру психотропной активности. Подобные факты позволили рассматривать эпифиз в качестве органа, участвующего в глобальной защите мозга от стресса любого происхождения [2, 4]. МТ способен лимитировать и аффективные расстройства. На различных экспериментальных моделях психической депрессии у него выявлены антидепрессивные свойства. Данное положение впервые было продемонстрировано нами при оценке временной динамики принудительного плавания у крыс. МТ (в дозах 1—2 мг/кг) не только ограничивал длительность периодов неподвижности в воде, расцениваемых как показатель поведенческого «отчаяния» животного, но также снижал величину ритмологического индекса депрессивности. Одновременно он ослаблял выраженность действия ряда депрессогенных агентов (резерпина, клофелина) [25].

Предложение рассматривать МТ в качестве естественного антидепрессанта в своё время не получило поддержки в психофармакологии, однако, позднее французскими исследователями был создан оригинальный мелатонинергический препарат такого класса. Им является вальдоксан, который, превосходя отдельные традиционные антидепрессанты по лечебному эффекту и не влияя на центральную моноаминергическую передачу, избирательно стимулирует некоторые виды МТ и серотониновых рецепторов [10].

Ещё одна форма психотропной активности, обнаруженная у МТ, проявляется в его активирующем влиянии на когнитивные функции в виде улучшения памяти и способности к обучению. Это подтверждают результаты экспериментов, демонстрирующих восстановление функций после их нарушения в условиях иммобилизационного стресса или при использовании амнезирующих агентов. У таких животных страдает краткосрочная память, оцениваемая методом условно-рефлекторного пассивного избегания в челночном боксе или в водном лабиринте Морриса, и затрудняются процессы обучения. Повторные инъекции МТ (0,5—1 мг/кг) укорачивают латентность избежательного ответа и ускоряют выбор правильного пути в лабиринте с уменьшением числа ошибочных действий. Хирургическое удаление эпифиза, напротив, усугубляет поведенческие нарушения в обоих тестах. Эти данные позволяют говорить о наличии у МТ ноотропных свойств и рассматривать его в качестве потенциального когнитивного усилителя [5]. Результаты, полученные на основе эксперимента, совпадают с результатами наблюдений на людях. Регулярные приёмы МТ (3 мг) однозначно оптимизировали память у здоровых испытуемых в случае её ослабления в условиях психоэмоционального стресса [58]. Мнемотропные свойства гормона, обусловленные прямым вмешательством в деятельность мозговых структур, по-видимому, дополняются улучшением процессов восприятия. В частности МТ снижает пороги светочувствительности сетчатки глаза человека, особенно на фоне функционального ухудшения зрения [26].

У МТ выявлена также способность ослаблять разного рода неврологические расстройства, к числу которых относятся судорожные состояния, последствия черепно-мозговой травмы и инсульта. В пользу наличия у МТ противосудорожной активности свидетельствуют многочисленные экспериментальные доказательства, полученные в различных методических условиях у животных разных видов (преимущественно грызунов) и при использовании МТ в довольно широком диапазоне дозировок. Например, на модели коразоловых судорог у морских свинок МТ (в дозах 50—160 мг/кг) повышал порог эпилептиформных реакций и удлинял их латентный период. На фоне

хронического применения МТ (10—50 мг/кг), затруднялось возникновение пилокарпиновых судорог у крыс, труднее провоцировались кортикальные судорожные послеразряды на повторную стимуляцию амигдалы, выявлялась способность предупреждать электросудороги как при системном, так и внутрижелудочковом использовании и т.п. При этом нельзя не отметить, что такого рода защитный эффект достигается от доз МТ существенно превосходящих используемые для нормализации поведения [34, 62, 49].

Результаты исследований на людях, хоть и менее однозначны, однако, чаще подтверждают существование у МТ антиконвульсивных свойств. Так, чувствительность к нему обнаруживают преимущественно в детской неврологии при различных вариантах эпилепсии и эпилептиформных судорог, почти всегда сопряжённых с инсомнией. Установлено снижение количества судорожных пароксизмов, уменьшение их выраженности, тенденция к нормализации ЭЭГ и ночного сна у больных. Зачастую МТ с хорошим результатом использовали в комплексе с традиционной противосудорожной фармакотерапией (дифенин, карбамазепин и др.) и для преодоления резистентности к ней [32, 59, 67].

Протективные свойства обнаружены у МТ и в отношении последствий черепно-мозговой травмы. При её моделировании разными методами у экспериментальных животных наблюдаются поведенческие и неврологические расстройства, а также патохимические сдвиги в головном мозге близкие тем, которые описаны у людей. У выживших после механической травмы черепа или субарахноидальной гематомы грызунов дезорганизуется активность в обычных поведенческих тестах в сочетании с характерными мышечными и лабиринтными нарушениями. Хроническое (1—3 недели) предварительное введение МТ (в дозах до 10 мг/кг) существенно снижало смертность животных, поведенческий и неврологический дефицит, сопутствующие травматизации мозга. Одновременно под действием МТ наблюдалось ограничение зоны очага контузии, уменьшения отёка мозга, ускорения репаративных процессов [24, 33, 35, 60]. МТ оказался эффективен при острых расстройствах мозгового кровообращения и другого генеза, в частности, при инсульте. В пользу того, что он изначально входит в естественную систему защиты мозга от ишемического повреждения, свидетельствуют результаты опытов на животных, у которых разными способами (экстирпация эпифиза, длительное пребывание на свету) создавали искусственный дефицит гормона. В этих условиях гораздо значительнее проявляются поведенческие и морфологические последствия нарушений цереброваскулярной гемодинамики, обусловленных, например, окклюзией срединной мозговой

артерии либо кортикальным фототромбозом у крыс. С другой стороны, введение средних по величине доз МТ (4—5 мг/кг) в течение первых 1—2 часов после указанных процедур ограничивало у животных зону инфаркта мозга и степень его отёка. Учёт морфологических характеристик различных образований мозга (неокортекса, гиппокампа, стриатума) в сочетании с данными магнитно-ядерного резонанса подтверждает существование у эпифизарного гормона отчётливого нейропротективного эффекта. Подобные сведения позволили рекомендовать профилактическое назначение препаратов МТ пожилым пациентам, особенно имеющим высокий риск развития инсульта [7, 23, 46, 57].

Кроме того, лечебные возможности показаны у МТ при некоторых формах нейродегенеративной патологии головного мозга, подобных болезни Альцгеймера и паркинсонизму. По современным представлениям, ведущим патогенетическим фактором в возникновении болезни Альцгеймера может служить накопление в нейронах ростральных мозговых структур бета-амилоидного пептида, обладающего нейротоксическими свойствами. В экспериментах на животных локальные внутрицеребральные инъекции аналога этого пептида — соединения Абета провоцируют тяжёлые нарушения когнитивных функций, близкие дементным проявлениям у лиц, страдающих этим заболеванием. Хроническим введением в такой ситуации МТ (10—20 мг/кг) порой удаётся несколько ослабить выраженность мнестических расстройств. Некоторые, правда, достаточно ограниченные клинические результаты даёт и терапия с помощью МТ пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера. После длительных приёмов (от нескольких недель до нескольких месяцев) высоких доз гормонального препарата (обычно свыше 10 мг в сут) у них зарегистрировано улучшение показателей ночного сна, совпадавшее с определённой оптимизацией когнитивных функций [8].

Другой разновидностью нейродегенеративной патологии служит паркинсонический синдром с присутствием ему моторными проявлениями, дефектами в аффективной сфере и познавательной деятельности. Главную роль в генезе паркинсонизма придают нарушениям в отношениях чёрной субстанции среднего мозга с базальными ганглиями. В этой связи в качестве адекватного экспериментального аналога заболевания признаются двигательные и дементные расстройства, возникающие у грызунов при локальном введении им в чёрную субстанцию нейротоксинов 6-оксидофамина либо соединения МФТП (производного тетрагидропиридина) сопровождающиеся перерождением нигростриатных нейронов. Как установлено в опытах *in vivo* и *in vitro*, местное или систем-

ное применение МТ ограничивает гибель клеток чёрной субстанции и дегенерацию дофаминергических терминалей в полосатом теле, вызываемых нейротоксинами. Отсюда вполне резонным представляется использование МТ для лечения больных паркинсонизмом. К сожалению, несмотря на теоретическую обоснованность такого подхода, результаты пилотных плацебо-контролируемых испытаний вещества (10 недель по 5 или 50 мг МТ ежедневно) в клинике оказались достаточно скромными. Одной из причин, как и в случае болезни Альцгеймера, могло служить то обстоятельство, что далеко зашедший нейродегенеративный процесс всегда с большим трудом поддаётся любой медикаментозной коррекции [9].

Сердечно-сосудистые расстройства

Наряду с мозговой деятельностью, МТ вмешивается в функции и сердечно-сосудистой системы. К настоящему моменту этому вопросу посвящено значительное число экспериментальных и клинических исследований. Полученные результаты обобщены в комплексе обзорных публикаций, позволяющих отказаться от цитирования конкретных источников [19, 20, 22, 29, 42]. Судя по их анализу, представленному ниже, под влиянием МТ проявляются положительные терапевтические эффекты, как со стороны системного артериального АД, так и в работе сердца.

Полученные в опытах на здоровых животных и при перфузии изолированных сосудов представлены достаточно разноречивые сведения о вазоактивных свойствах МТ. По одним его применение способствует повышению сосудистого тонуса с увеличением артериального давления, по другим он, напротив, может вызывать гипотензию. Однако на экспериментальных моделях артериальной гипертензии зарегистрированы более однонаправленные сдвиги. У спонтанно гипертензивных крыс в широком диапазоне доз (1—30 мг/кг) при остром или хроническом введении МТ устойчиво понижает среднее артериальное давление без значимых сдвигов со стороны частоты сердечных сокращений. Точно также он ограничивает гипертензию у животных, индуцированную электрошоковым стрессом. Напротив, удаление эпифиза у крыс приводит к стойкому повышению давления, и такой эффект успешно устраняется введением экзогенного МТ.

Выводы из экспериментальных работ о наличии у МТ антигипертензивных свойств совпадают с результатами клинических исследований. Так, многолетние наблюдения за значительной группой молодых женщин показали, что понижение плазменного уровня МТ у них заметно повышает риск развития гипертонической болезни. В тоже время регулярное профилактическое назначение им МТ (1 мг ежедневно) по-

зволяет предупреждать гормональный дефект, а потому и возникновение патологии. Повторное (на протяжении 4—6 недель) использование одного только МТ (от 2 до 6 мг ежедневно перед сном) у больных с эссенциальной гипертензией I—II стадии обеспечивало снижение как систолического, так и диастолического давления по сравнению с контрольными приёмами плацебо. Интересно, что у лиц с высоким ночным пиком плазменной концентрации МТ гораздо ниже оказывается и величина артериального давления в эти часы. Наконец, комбинацией МТ с обычными антигипертензивными средствами удаётся получить более выраженный клинический эффект и одновременно лимитировать побочные реакции традиционных препаратов.

Сходную тенденцию в виде незначительного или разнонаправленного влияния на физиологические показатели у здоровых людей и животных надо констатировать и при оценке кардиотропных свойств МТ. Так, определение вариативности сердечного ритма у крыс свидетельствовало о некоторой парасимпатизации кардиоинтервалограммы под влиянием низкой дозы МТ (0,1 мг/кг), которая, однако, не прогрессировала, но, напротив, ослабевала с увеличением дозировок препарата (до 0,5 и 1 мг/кг). Точно также нестабильную брадикардию регистрировали и у обезьян (после введения 0,2—0,4 мг/кг МТ). У молодых здоровых женщин брадикардические свойства МТ (ежедневно 1 мг) удаётся обнаружить только при подразделении испытуемых в зависимости от их хронотипических особенностей. С другой стороны, эпифизарный дефицит усугубляет у животных кардиальную патологию, а введение экзогенного МТ способствует её ограничению.

Действительно, выраженность нарушений сердечного ритма и смертность у крыс при ишемии-реперфузии миокарда возрастала после удаления эпифиза, тогда как предварительные инъекции МТ (0,4 мг/кг) обеспечивали явный защитный эффект. Оральной потреблении (2,5 или 5 мг/кг) гормонального препарата животными в период постишемической реперфузии отчётливо улучшало сократимость миокарда и увеличивало сердечный выброс. Специфичность такого действия подтверждалась его устранением антагонистом МТ рецепторов лузиндолом. Кардиопротективные свойства МТ обнаружены и на фоне экспериментального инфаркта у крыс, вызванного лигированием коронарной артерии, и на изолированных сердцах. В последнем случае добавление вещества в перфузионную жидкость не только ослабляло выраженность и длительность реперфузионной аритмии и постишемической дисфункции миокарда, но также вызывало коронарную вазодилатацию.

С учётом изложенного вполне объяснимы результаты первых клинических испытаний МТ в виде монотерапии и в сочетании со специфическими средствами при лечении кардиальных больных. Изолированно и особенно в комплексе с другими препаратами МТ (3 или 6 мг) существенно повышал эффективность лечения. Это проявлялось в ослаблении нарушений сердечного ритма, уменьшении количества ангинозных приступов и их продолжительности, в снижении потребности в нитроглицерине и увеличении толерантности к физическим нагрузкам. Интересно, что показана обратная зависимость между классом ишемической болезни сердца и уровнем экскреции с мочой МТ. По некоторым данным, у больных с коронарной патологией отсутствует обычная возрастная динамика выработки гормона в сравнении со здоровыми людьми. На этом основано предложение профилактического использования МТ для предупреждения смерти от внезапной остановки сердца у пожилых людей.

Патология ротовой полости и желудочно-кишечного тракта

Защитные свойства МТ неоднократно демонстрировались в большом числе исследований при различных формах экспериментальной и клинической патологии, сопряжённой с поражением различных отделов пищеварительной системы. Сюда относятся стоматологические заболевания, язвенные поражения слизистой желудка и кишечника, нарушения секреторной активности поджелудочной железы.

Возможности использования МТ в стоматологии ранее уже были рассмотрены в серии обзорных публикаций, позволяющих бегло остановиться лишь на нескольких аспектах данной проблемы [21, 41, 47, 61]. Физиологическая роль МТ в полости рта, прежде всего, может сводиться к усилению секреторных процессов слюнных желез. На это указывает тот факт, что внутривенная инфузия МТ наркотизированным крысам (правда, в относительно высоких дозах 5 или 25 мг/кг) провоцирует усиленную выработку слюны. Напротив, МТ недостаточность вследствие эпифизэктомии ведёт к развитию сухости в ротовой полости крыс и изъязвлению слизистой оболочки, тогда как ежедневные инъекции МТ (1 мг/кг) успешно нивелируют такие нарушения. Способность ослаблять проявление воспаления сочетается у него с некоторыми противоинфекционными свойствами. В частности, у больных оральным герпесом повторные приёмы МТ (2,5 мг ежедневно) ограничивали выраженность герпетических поражений слизистой рта.

Естественный МТ имеет также непосредственное отношение к развитию зубов, впрочем, как и росту

костного скелета в целом. По данным иммуногистохимического анализа, МТ рецепторы определённого типа могут экспрессировать амелобласты, внешние дентальные эпителиальные клетки и одонтобласты зубной ткани. Таким путём он способен регулировать функцию одонтогенных зачатков зубов у животных и человека. Поддерживая нормальное состояние периодонта, МТ в тоже время может осуществлять защиту ротовой полости от токсического воздействия используемых в ортопедической стоматологии полимеров. Наконец, МТ участвует в ограничении опухолевого процесса, сдерживая, например, рост оральной эпидермальной карциномы в эксперименте.

Участие МТ в защите слизистой оболочки желудка и кишечника от повреждений разного рода — один из наиболее разработанных и лучше других клинически обоснованных аспектов его протективной роли в организме. Полученный фактический материал, как и в описанных выше ситуациях, уже неоднократно обобщался в прошлом [30, 36, 37, 39, 59]. На его основании правомерно сделать вывод о том, что введение МТ (в дозах от 5 до 10 мг/кг) животным разных видов с экспериментальными язвами желудка и кишечника различного происхождения обеспечивает надёжный защитный эффект. Он связан с ограничением секреции желудочных желёз, понижением тонуса гладкой мускулатуры желудка и кишечника, усилением регенеративных процессов в слизистой оболочке. Наоборот, функциональная или хирургическая инактивация эпифиза заметно отягощает картину гастроинтестинальной патологии.

С указанными сведениями хорошо согласуются результаты многочисленных и плацебо-контролируемых испытаний МТ в клинических условиях. Лечебное действие гормонального препарата (5—6 мг ежедневно в течение 2—4 недель) доказано при гиперацидных гастритах, язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки, рефлюксной болезни. В этих случаях особенно чёткий результат давало комбинированное назначение МТ с омепразолом или холиноблокирующими веществами. Обоснованы лечебные возможности МТ также при колите, в том числе язвенном и синдроме раздражённой кишки.

МТ оказался эффективным и при заболеваниях поджелудочной железы, о ограничивает нарушения экскреторной и инкреторной функции, в частности, при остром панкреатите и сахарном диабете [13, 14, 40, 45, 50, 52]. Например, на модели острого панкреатита, моделируемого у крыс церулеином либо с помощью сосудистых нарушений при ишемии-реперфузии железы, предварительные инъекции МТ (кстати, только в высоких дозах — 10 или 50 мг/кг) препятствовали формированию морфологической деструкции панкреатических структур. Одновременно снижались проявле-

ния оксидантного стресса и выработка провоспалительных цитокинов. МТ был способен нормализовать состав микроэлементов в повреждённой ткани мозга и поджелудочной железы у животных с тяжёлой интоксикацией фосфорорганическими соединениями. Защитное влияние МТ распространяется, очевидно, не только на первично поражённую поджелудочную железу, но и на соседние органы, вовлекаемые в патологический процесс, к числу последних относится печень. Так, у крыс с панкреатитом, вызванным церулеином, профилактическое использование МТ (20 мг/кг), наряду с нормализацией антиоксидантного статуса железы, провоцировало аналогичные сдвиги в ткани печени с восстановлением активности аланинтрансаминазы. При моделировании разными способами острого панкреатита удаление эпифиза неизменно отягощало биохимические и морфологические нарушения в поджелудочной железе и печени животных.

Совокупность экспериментальных и клинических наблюдений позволяет предполагать существование у МТ и антидиабетических свойств. Известно, что стрептозототин провоцирует у крыс нарушения углеводного обмена, близкие сахарному диабету 1 типа человека. Гипергликемия в таком случае сочетается с изменением толерантности к углеводной нагрузке, снижением в печени активности глюкокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, ограничением антиоксидантного статуса организма в целом. Повторное предварительное введение МТ (5 мг/кг, 2 нед.) предупреждает появление указанных нарушений. У крыс линии Goto-Kakizaki, на которых воспроизводят аналог диабета 2-го типа людей, напротив, показаны гиперинсулинемия и гиперлипидемия, снижение активности тирозинкиназы рецептора инсулина. Однако и в этой ситуации у МТ установлен отчётливый антидиабетический эффект с ликвидацией указанных нарушений. С выводом об антидиабетической активности МТ согласуются и результаты опытов *in vitro*. Например, в островковом аппарате Лангерганса мышей с аллоксановыми диабетом неизменно отмечаются тяжёлые дегенеративные изменения. Если же такие животные предварительно получали МТ (0,15 мг/кг, в течение 2 нед.), то число и структура выделенных у них бета-клеток почти идентичны клеточным элементам интактных мышей.

Всё ещё немногочисленные исследования на людях подтверждают вероятность существования у МТ защитных свойств при диабете. Так, у больных, страдающих метаболическим синдромом, ассоциированным с диабетом 2-го типа, расстраивается нормальное соотношение между плазменным содержанием МТ и инсулина. При назначении им на протяжении месяца МТ (5 мг) продемонстрировано улучшение клиниче-

ского состояния пациентов с позитивными сдвигами в их оксидантном статусе.

Помимо перечисленных выше патологических состояний, протективные возможности МТ описаны в современной литературе и в целом ряде других ситуаций, на которых, к сожалению, не позволяют оставаться ограниченные рамки статьи. К ним относятся его давно доказанная онкостатическая активность, защитное влияние на систему крови (нормализация функции эритроцитов и лейкоцитов, нормализация тромбоцитарного гемостаза), инфекционная, акушерская и перинатальная патология, как и ряд других патологических состояний.

Клеточные и системные механизмы защитных свойств МТ

На основании приведённых фактов, несмотря на беглый характер их цитирования (представлены лишь отдельные иллюстрации, подробнее см. ссылки в обзорных материалах), складывается впечатление о наличии у МТ способности обеспечивать довольно универсальную защиту от повреждающего воздействия едва ли ни любых органов и тканей с самыми различными физиологическими функциями. И в основе такой универсальности, по-видимому, лежат близкие, если не тождественные, клеточные и системные механизмы. Все они в совокупности направлены на коррекцию возникающих при патологии в организме животных и человека отклонений от нормы. В подобной коррекции, несомненно, должны участвовать как центральный (эпифизарный), так и образующийся на периферии (региональный) МТ.

Защита клеток мелатонином реализуется двумя способами: посредством специфических рецепторов и неспецифическим (внерецепторным) путём. В первом случае речь идёт о мобилизации МТ рецепторов разных типов, имеющих мембранную и ядерную локализацию. Они идентифицированы практически во всех органах и тканях. Функциональный смысл их существования, по-видимому, определяется необходимостью универсальной модуляции любых физиологических процессов. В частности, в головном мозге рецепторные механизмы обуславливают вмешательство МТ в активность нейромедиаторных систем и деятельность эмоциогенных структур, в сосудистой стенке регулируют образование вазоактивных факторов, в миокарде обеспечивает кардиопротекцию, в желудочно-кишечном тракте — коррекцию синтеза соляной кислоты, за счёт иммуномодуляции контролирует противоопухолевую защиту тканей и т.п. Для биологии МТ существенно, что активацию специфических МТ рецепторов дополняет его способность легко

проникать через клеточные мембраны и без участия рецепторов вмешиваться в метаболизм цитозоля.

На клеточном уровне протективный эффект МТ обусловлен, вероятно, комплексом причин, среди которых на первое место по значимости, следует поставить его антиоксидантную активность. По современным представлениям, усиление окислительного стресса отягощает большинство видов патологии, сопровождающихся повреждением клеток. В свою очередь антиоксидантное действие МТ определяется совокупностью механизмов. Проникая в клетку, без участия специфических рецепторов он демонстрирует уникальную способность инактивировать свободные радикалы кислорода и азота, служить их своеобразной «ловушкой». За счёт этого МТ эффективно ограничивает процессы перекисного окисления липидов, обеспечивая универсальную защиту любых живых клеток от повреждения. Свою антиоксидантную защиту МТ реализует не только за счёт нейтрализации свободных радикалов, но также через повышение антиоксидантного статуса организма в целом, причём существенно превосходя по этому критерию другие известные антиоксиданты, подобные аскорбиновой кислоте и токоферолу. Его антиоксидантная роль включает в себя увеличение активности антиоксидантных ферментов (пирувоксидазы, каталазы, супероксиддисмутазы), усиление синтеза глутатиона и ослабление роли прооксидантных энзимов [15, 27, 56, 65]. В качестве дополнительного, терапевтически ценного следствия ограничения МТ оксидантного стресса надо, по-видимому, рассматривать его способность устранять митохондриальную дисфункцию, возникающую при кардиоваскулярной, возрастной, нейродегенеративной патологии. Достаточно селективно воздействуя на мембраны митохондрий, он выступает в роли регулятора их биоэнергетической функции [64].

Терапевтическим фактором одновременно системного и регионального значения следует признать иммунотропную активность МТ. Между тем слабость иммунной защиты, является патогенетическим фактором не только инфекционных, но и ряда соматических заболеваний. Знаменательно, что иммунотропные свойства МТ зачастую отличает модуляторный характер в виде усиления иммунологической реактивности на фоне её предшествующего снижения и, напротив, ограничение в условиях исходной гиперактивности иммунной системы. Гормональный контроль может осуществляться над деятельностью и центральных аппаратов управления её функцией, и периферических клеточных элементов гуморального и тканевого звеньев иммунитета [18, 38, 55].

К перечисленным моментам защитного действия МТ на клеточном уровне необходимо добавить ещё

ряд факторов. Так, в центральной нервной системе и на периферии гормон МТ демонстрирует отчётливую противовоспалительную активность, ограничивая выработку противовоспалительных цитокинов и повышая прочность соединительной ткани. Он ограничивает также воспалительный процесс инфекционного происхождения, демонстрируя противомикробную активность, вследствие чего отмечается его эффективность при септическом шоке и синергический эффект с нестероидными противовоспалительными средствами [48, 51, 53]. Кроме того, в опытах на животных и исследованиях на людях у МТ обнаружены болеутоляющие свойства. Клеточные механизмы обезболивающей активности МТ, дополняющие противовоспалительное действие, определяются его ингибирующим влиянием на процессы генерации и передачи болевых сигналов в головном мозге и на уровне периферических болевых рецепторов [16, 31, 43, 63]. Нельзя, наконец, игнорировать его сдерживающее влияние на апоптоз с одновременным усилением репаративных процессов в повреждённых тканях [66].

С точки зрения системных механизмов ведущее значение должно иметь кардинальное свойство МТ — обеспечивать восстановление, синхронизацию биологических ритмов разной частоты и формирование, в первую очередь, более чёткого суточного ритма. На этом, очевидно, базируется способность экзогенного МТ оказывать гипногенное действие, ликвидировать проявления широтного десинхроноза [6, 68]. Стабилизация ритмических процессов служит одной из причин устойчивости к различным патогенным воздействиям, коль скоро дезорганизация биоритмов служит обязательным аккомпанементом любого заболевания, а также слагаемым лечебного действия многих фармакологических средств. Ритмстабилизирующий эффект МТ может определяться его сдерживающим влиянием на функцию нейронов супрахиазматических ядер гипоталамуса, выступающих в роли регулятора суточных колебаний многих физиологических функций. При этом между ритмоводителем и эпифизом устанавливаются тесные взаимные морфофункциональные связи с формированием единого хронобиологического блока [3].

Другим важным составным элементом всякой успешной терапии системного характера, как полагаем, надо признать комплексное влияние МТ на процессы высшей нервной деятельности. Уникальный профиль психофармакологической активности гормона складывается из одновременной нормализации системы сон—бодрствование, эмоциональной реактивности, аффективной и когнитивной сфер. В конечном счёте, это определяет своеобразную стабилизацию психической деятельности [11]. В сочетании с ритморганизующими свойствами МТ достигается не

только усиление специфической активности психотропных средств разных классов, но и повышение общей резистентности организма, а у людей к этому добавляется ещё и субъективное улучшение самочувствия. Как очевидно, оптимальный психоэмоциональный настрой пациентов важен для успешной медикаментозной борьбы с любыми формами патологии.

У эпифизарного МТ среди прочего показана способность вмешиваться в деятельность периферических эндокринных желёз. Отчасти проявлением его глобальных антистрессорных эффектов может служить, например, модуляция выработки гормонов корой надпочечников. Как свидетельствовал проведённый нами ранее анализ собственных наблюдений и литературных данных, в условиях патологической адренкортикальной гиперактивности начинают выходить на первый план опосредуемое МТ тормозные влияния эпифиза на секрецию кортикостероидов, замаскированные в условиях физиологической нормы [17].

МТ — универсальное лечебное средство?

Можно предположить, что препараты МТ, или созданные на его основе соединения, эффективны при самых разных заболеваниях. Однако считать МТ «панацеей» от всех болезней ещё преждевременно. Дело в том, что предпринимавшиеся в прошлом неоднократные попытки в клинических условиях оценить теоретически хорошо обоснованные возможности МТ порой не всегда завершались успешно. Среди вероятных причин слабой выраженности его эффектов можно назвать целый комплекс переменных факторов к числу которых, несомненно, относятся неадекватность использованной дозы вещества и неверный выбор времени (суток, сезона года) введения, исходный эндокринный статус организма и т.п. Однако, пожалуй, наиболее существенным, на наш взгляд, моментом является игнорирование именно модуляторного характера самого действия МТ.

Исходя из понимания естественной биологической роли эпифиза, его основной гормон не может (да и не должен) давать выраженный терапевтический эффект. Как мы неоднократно подчёркивали ранее, основная роль эпифиза в организме — адаптогенное подстраивание функций человека и животных к меняющимся условиям внешней и внутренней среды. Железа принадлежит к разряду церебральных и эндокринных образований, осуществляющих стационарирование гомеостаза в целом [6], А потому МТ не несёт прямой ответственности за какие-либо конкретные физиологические процессы. В задачу и центрального (эпифизарного), и регионального гормона должна входить всего лишь их поправочная регуляция,

в условиях, когда они отклоняются от нормы. По этой причине, на наш взгляд, введение экзогенного МТ обычно не оказывает влияния на здоровый организм, что порой ложно принимается за свидетельство отсутствия у него тех или иных свойств. Чтобы выявить его патофизиологическую миссию, терапевтически ценный эффект, очевидно, необходимо наличие исходного пограничного патологического состояния.

С другой стороны, исходя из представления о защитном характере модулирующей роли МТ, не приходится ожидать значительных результатов при его использовании на фоне далеко зашедшей патологии. В этом случае по вполне понятным причинам оказываются эффективны (и то далеко не всегда) предназначенные для такой цели средства специфической фармакотерапии. Однако, по нашему мнению, изложенные выше соображения не дают права для скептических оценок представленных в настоящей работе результатов экспериментальных и клинических наблюдений.

Терапевтические возможности МТ могут и, как полагаем, должны быть востребованы в комплексной фармакотерапии самых различных заболеваний головного мозга и периферических органов. Перспективность указанного подхода подтверждает проведённый нами ранее анализ литературного материала, свидетельствующий о его способности потенцировать специфическое действие препаратов разных фармакологических групп [12]. По-видимому, именно в такой адаптогенной и одновременно аддитивной роли этот малотоксичный и сравнительно безопасный препарат в дальнейшем привлечёт к себе ещё больше внимание исследователей и клиницистов, весьма возможно, в качестве универсального лекарственного модулятора нарушенных функций. Впрочем, для более широкой экстраполяции данного вывода на лечебную практику, несомненно, нужны дополнительные рандомизированные и плацебо-контролируемые исследования.

References

1. Anisimov V.N. *Melatonin: role in organism, application in clinical practice*. Sanct-Peterburg, 2007. (in Russian)
2. Arushanian E.B. Pineal participation in anti-stress brain protection. *Uspechi Fisiol. Nauk*. 1996; 27: 31-50. (in Russian)
3. Arushanian E.B. Complex interrelation suprachiasmatic nuclei of hypothalamus with pineal gland and striatum — unitary system for regulation of circadian fluctuations of the behaviour. *Zhurn. Vyssh. Nervn. Dejaj*. 1996; 46: 15-22. (in Russian)
4. Arushanian E.B. Anti-stressor features of pineal melatonin. *Melatonin in norm and pathology*. Moscow. *Medpractica*. 2004: 198-222. (in Russian)

5. Arushanian E.B. Pineal hormone melatonin — new nootropic drug? *Eksp. klin. Farmakol.* 2005; 68: 74-9. (in Russian)
6. Arushanian E.B. *Unique melatonin*. Stavropol. 2006. (in Russian)
7. Arushanian E.B. Protective role of melatonin on cerebral circulation disturbances. *Rus. Med. Zhurn.* 2010a; 18: 57-61. (in Russian)
8. Arushanian E.B. Melatonin and Alzheimer disease. *Zhurn. Nevrol. i psichiatr.* 2010b; 110: 100-6. (in Russian)
9. Arushanian E.B. Hormonal drug melatonin in therapy cognitive disturbances on parkinsonism. *Eksp. klin. Farmakol.* 2010c; 2011; 73: 35-9. (in Russian)
10. Arushanian E.B. Melatoninergic antidepressant valdoxan. *Eksp. klin. Farmakol.* 2011a; 41-5. (in Russian)
11. Arushanian E.B. Melatonin — universal stable factor of psychological activity. *Zhurn. Vyssh. Nervn. Dejat.* 2011b; 61: 645-59. (in Russian)
12. Arushanian E.B. Pineal melatonin in complex pharmacotherapy of the brain and somatic diseases. *Eksp. klin. Farmakol.* 2011c; 74: 39-45. (in Russian)
13. Arushanian E.B. Protective role of melatonin after pancreas diseases. *Eksp. klin. Farmakol.* 2012a; 75: 42-8. (in Russian)
14. Arushanian E.B. Melatonin and diabetes. *Melatonin: Application in clinic practice Moscow*. Imapress; 2012b: 30-9. (in Russian)
15. Arushanian E.B. Limitation of oxidative stress as main reason of the melatonin universal protective features. *Eksp. klin. Farmakol.* 2012d; 75: 44-9. (in Russian)
16. Arushanian E.B. Analgetic activity of pineal hormone melatonin. *Eksp. klin. Farmakol.* 2012e; 75: 44-8. (in Russian)
17. Arushanian E.B., Arushanian L.G., Elbekian K.S. Place of pineal-adrenocortical relationships in corrective regulation of the behaviour. *Uspechi Fisiol. Nauk.* 1993; 24: 73-9. (in Russian)
18. Arushanian E.B., Beyer E.V. Immunotropic features of pineal melatonin. *Eksp. klin. Farmakol.* 2002; 63: 73-8. (in Russian)
19. Arushanian E.B., Beyer E.V. Pineal hormone of melatonin and function of cardio-vascular system. Report 1. Influence of the melatonin on arterial pressure in norm and pathology. *Med. Vestn. Sev. Kavkasa* 2011a; 1: 69-73. (in Russian)
20. Arushanian E.B., Beyer E.V. Pineal hormone of melatonin and function of cardio-vascular system. Report 2. Influence of melatonin on cardiac activity in norm and pathology. *Med. Vestn. Sev. Kavkasa*. 2011b; 2: 90-5. (in Russian)
21. Arushanian E.B., Karakov K.G., Elbekian K.S. Therapeutic possibilities of melatonin on stomatologic diseases. *Eksp. klin. Farmakol.* 2012; 75: 48-52. (in Russian)
22. Arushanian E.B., Mastjagina O.A. Significance of melatonin for cardio-vascular activity and its pharmacological regulation. *Eksp. klin. Farmakol.* 2008; 71: 65-71. (in Russian)
23. Arushanian E.B., Naumov S.S. Stroke and pineal gland. *Zhurn. Nevrol. i Psichiatr.* 2009; 109: 67-74. (in Russian)
24. Arushanian E.B., Naumov S.S., Ponomareva V.A. Protective influence of the melatonin on behavioural and morphological disturbances, induced by rat's cranial trauma in different day time. *Eksp. klin. Farmakol.* 2009; 72: 18-21. (in Russian)
25. Arushanian E.B., Ovanesov K.B. Pineal role in psychological depression. *Zhurn. Vyssh. Nervn. Dejat.* 1991; 14: 822-7. (in Russian)
26. Arushanian E.B., Ovanesov K.B., Ovanesova I.M. Comparative influence of melatonin and bilobil on light sensitivity and psychophysiological indices at persons with cranial trauma. *Eksp. klin. Farmakol.* 2007; 70: 20-3. (in Russian)
27. Djerieva I.S., Volkova N.I. Nitrooxidative stress and possibilities its correction by melatonin. *Melatonin: Application in clinic practice*. Moscow. Imapress; 2012: 125-34. (in Russian)
28. Kvetnoy I.M., Kvetnaya T.V., Rajchlin N.T. Extraneal melatonin: place and role in neuroendocrine homeostasis regulation. *Melatonin in norm and pathology*. Moscow. Medpractica. 2004: 34-47.
29. Malinovskaya N.K., Komarov F.I., Rapoport S.I. et al. *Melatonin and cardio-vascular system. Melatonin in norm and pathology*. Moscow. Medpractica. 2004: 85-101.
30. Malinovskaya N.K., Komarov F.I., Rapoport S.I. Melatonin in ulcer therapy. *Melatonin in norm and pathology*. Moscow. Medpractica. 2004: 146-67. (in Russian)
31. Ambriz-Tufuti M., Rocha-Gonzalez H., Cruz S.L. et al. Melatonin: a hormone that modulates pain. *Life Sci.* 2009; 84: 489-98.
32. Ardura J., Andres J., Gaemendia J.R. Melatonin in epilepsy and febrile seizures. *J. Child. Neurol.* 2010; 25: 888-91.
33. Ayer R.E., Sugawara T., Zhang J.H. Effects of melatonin in early brain injury following subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir.* 2008; 102: 329-30.
34. Banach M., Gurdziel E., Jedrych M. Melatonin in experimental seizures and epilepsy. *Pharmacol. Rep.* 2011; 63: 1-11.
35. Bayir A., Kiresi D.A., Kara H. et al. The effects of mannitol and melatonin on MRI findings in an animal model of traumatic brain edema. *Acta Neurol. Belg.* 2008; 108: 149-54.
36. Brzozowska P., Ptah-Belowska S., Pavlik M. et al. Mucosal strengthening activity of central and peripheral melatonin in the mechanism of gastric defense. *J. Physiol. Pharmacol.* 2009; 60: 47-56.
37. Bubenik G.A. Thirty four years since the discovery of gastrointestinal melatonin. *J. Physiol. Pharmacol.* 2008; 59: 33-51.
38. Carrillo-Vico A., Reiter R.J., Lardone P.J. et al. The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 2006; 7: 423-31.
39. Choinacki C., Wisniewska-Jaroiniska M., Walecka-Kapica et al. Evaluation of melatonin effectiveness in the adjuvant treatment of ulcerative colitis. *J. Physiol. Pharmacol.* 2011; 62: 327-34.
40. Col C., Dinler K., Hasdemir O., et al. Exogenous melatonin treatment reduces hepatocyte damage in rats with experimental acute pancreatitis. *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.* 2010; 17: 682-7.
41. Cutando A., Aneiros-Fernandez J, Aneiros-Cachaza J. Melatonin and cancer: current knowledge and its application to oral cavity tumors. *J. Oral. Pathol. Med.* 2011; 38: 164-75.
42. Dominguez-Rodriguez A. Melatonin in cardiovascular diseases. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 2012; 21: 1593-6.
43. Esposito E., Patriniti I., Mazzon E. et al. Melatonin reduces hyperalgesia associated with inflammation. *J. Pineal Res.* 2010; 49: 321-31.

44. Hardeland R., Cardinali D.P., Srinivasan V. et al. Melatonin — a pleotropic, orchestrating regular molecule. *Progr. Neurobiol.* 2011; 93: 350-584.
45. Jaworek J., Szklarczyk J., Jaworek A.K. et al. Protective effect of melatonin on acute pancreatitis. *Int. J. Inflamm.* 2012; 76: 1736-75.
46. Kondoh T., Uneyama M., Nashino H. Melatonin reduces cerebral edema formation caused by transient forebrain ischemia in rats. *Life Sci.* 2002; 72: 583-90.
47. Kumasaka S., Shimozuma M., Kawamoto T. et al. Possible involvement of melatonin in tooth development: expression of melatonin 1a receptor in human and mouse tooth germs. *Histochem. Cell. Biol.* 2010; 133: 577-584.
48. Laliena A., San Miguel B., Crespo I. et al. Melatonin attenuates inflammation and promotes regeneration in rabbits with fulminant hepatitis of viral origin. *J. Pineal Res.* 2012; 53: 270-8.
49. Lima E., Cabral F.R., Cavalheiro E.A. et al. Melatonin administration after pilocarpine-induced status epilepticus: a new way to prevent or attenuate postlesion epilepsy? *Epilepsy Behav.* 2011; 20: 607-12.
50. Mulder H., Nagorny C.L., Lyssenko V. Melatonin receptors in pancreatic islets: good morning to a novel type 2 diabetes gene. *Diabetologia.* 2009; 52: 1240-9.
51. Oliveira L.G., Kuehn C.C., Santos C.D. et al. Enhanced protection by melatonin and meloxicam combination in experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* 2010; 32: 245-51.
52. Peschke E. Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. *J. Pineal Res.* 2008; 44: 26-40.
53. Radogna F., Diederich M., Ghibelli L. Melatonin: a pleotropic molecule regulating inflammation. *Biochem. Pharmacol.* 2010; 80: 1844-52.
54. Reiter R.J. Melatonin: its sources, its message and the interpretation message. *Adv. Pineal Res.* 1989: 165-73.
55. Reiter R.J., Calvo J.R., Karbownik M. et al. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2000; 917: 376-86.
56. Reiter R.J., Tan D.X., Jou M.J. et al. Biogenic amines in the reduction of oxidative stress: melatonin and its metabolites. *Neuro Endocrinol. Lett.* 2008; 29: 391-8.
57. Reiter R.J., Tan D.-X., Leon J. et al. When melatonin gets of your nerves: its beneficial actions in experimental models of stroke. *Exp. Biol. Med.* 2005; 230: 104-17.
58. Rimmele U., Spilmann M., Wolf O.T. et al. Melatonin improves memory acquisition under stress. *Psychopharmacology* 2009; 202: 663-72.
59. Sanzez-Barselo E.J., Mediavilla H., Tan D.-X. Clinical uses of melatonin: evaluation of human trials. *Curr. Med. Chem.* 2010; 17: 2070-96.
60. Sarrafzadeh A.S., Thomale U.W., Kroppenstedt S.N., Neuroprotective effect of melatonin on cortical impact injury in the rat. *Acta Neurochir.* 2000; 142: 1293-9.
61. Shimozuma M., Tokuyama R., Tatehara S. et al. Expression and cellular localization of melatonin-synthesizing enzymes in rat and human salivatory glands. *Histochem. Cell. Biol.* 2011; 13: 389-96.
62. Solmaz I., Gurkanlar D., Goksoy C. et al. Antiepileptic activity of melatonin in guinea pigs with pentylenetetrazol-induced seizures. *Neurol. Res.* 2009; 31: 989-95.
63. Srinivasan V., Pandi-Perumal S.R., Spence D.W. et al. Potential use of melatonergic drugs in analgesia: mechanisms of action. *Brain Res. Bull.* 2010; 81: 362-71.
64. Srinivasan V., Spence D.W., Pandi-Perumal S.R. et al. Melatonin in mitochondrial dysfunction and related disorders. *Int. J. Alzheimer Dis.* 2011; 21: 234-45.
65. Tousoulis D., Briasoulis A., Papageorgiou N. et al. Oxidative stress and endothelial function: therapeutic interventions. *Recent Pat. Cardiovascular Drug Discov.* 2011; 6: 103-14.
66. Tunon M.J., San Miguel B., Crespo J. et al. Melatonin attenuates apoptotic level damage in fulminant hepatic failure, induced by the rabbit hemorrhagic disease virus. *J. Pineal Res.* 2011; 50: 38-45.
67. Uberos J., Augustin-Morales M.O., Molina-Carbello A. et al. Normalization of the sleep wake pattern and melatonin and 6-sulphatoxy-melatonin levels after a therapeutic trial with melatonin in children with severe epilepsy. *J. Pineal Res.* 2011; 50: 192-6.
68. Zawilska J.B., Skene D.J., Arendt J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacol. Rep.* 2009; 61: 383-410.

Поступила 05.11.14

Сведения об авторах:

Щетинин Евгений Вячеславович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии СтГМУ

Петрищев Н.Н.¹, Цибин А.Ю.¹, Семенов Д.Ю.¹, Беркович А.Е.²,
Юкина Г.Ю.¹, Блюм Н.М.¹, Ефимов А.Н.¹, Бурсиан А.А.², Сенчик К.Ю.²

Применение фокусированного ультразвука высокой интенсивности для облитерации вен в эксперименте

¹ — ГБОУ высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский государственный университет им. И.П. Павлова» Минздрава России, 197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 6-8

² — Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», 195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., д. 29

Цель исследования — изучение влияния фокусированного ультразвука высокой интенсивности (ФУВИ) на структурные компоненты стенки вен.

Методика. Для генерации ультразвука и прицельного воздействия на сосуды был использован специальный стенд, включающий фокусирующий сферический силовой излучатель; напряжение питания генератора силового излучателя 25 В, частота силового излучения 1,9 МГц, интенсивность ультразвука в фокальном пятне составляла приблизительно 8,7 кВт/см².

Результаты. После однократного воздействия ФУВИ (15 с) на бедренную вену отмечена частичная десквамация эндотелия, вакуолизация цитоплазмы миоцитов, дезорганизация и коагуляция коллагеновых волокон. При импульсном воздействии ФУВИ (5 импульсов по 5 с) на заднюю полую вену наблюдались коагуляционные изменения во всех отделах стенки вены, участки фибриноидного некроза, выраженная десквамация эндотелия, зоны отторжения интимы. Изменения коллагена в средней оболочке и адвентиции вен свидетельствует о том, что примененная технология воздействия ФУВИ на вены обеспечивает повышение температуры в зоне облучения около 60°C. В мышцах, прилежащих к вене и попавших в зону воздействия ФУВИ определяется отек стромы и мышечных волокон, фрагментации и коагуляции в части волокон, изменение хромогенности, нейтрофильная инфильтрация. Эти изменения можно оценить как проявление острого повреждения (острый фасциит). В прилегающих к сосудам жировой клетчатке также имеет место отек и липолиз, диapedезные кровоизлияния, лейкоцитарная инфильтрация. Структурные изменения в стенке вен после воздействия ФУВИ рассматриваются как основа последующей облитерации.

Заключение. Воздействие фокусированного ультразвука высокой интенсивности на вены вызывает структурные изменения в их стенке, которые можно рассматривать как основу последующей облитерации.

Ключевые слова: фокусированный ультразвук высокой интенсивности; ФУВИ-технологии; облитерация вен; ультразвуковая термическая абляция

Для цитирования: Петрищев Н.Н., Цибин А.Ю., Семенов Д.Ю., Беркович А.Е., Юкина Г.Ю., Блюм Н.М., Ефимов А.Н., Бурсиан А.А., Сенчик К.Ю. Применение фокусированного ультразвука высокой интенсивности для облитерации вен в эксперименте. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016; 60(1): 89–93.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение о предоставлении субсидии № 14.578.21.0081 от 28.11.2014 г.).

Petrishchev N.N.¹, Tsibin A.U.¹, Semenov D.U.¹, Berkovich A.E.²,
Yukina G.U.¹, Blum N.M.¹, Efimov A.N.¹, Bursian A.A.², Senchik K.U.²

Applying HIFU for the obliteration of the veins in the experiment

¹ — State Educational Institution of Higher Professional Education «Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University» Russian Ministry of Health, Tolstoy Str. 6-8, St. Petersburg, 197022, Russia

² — Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University», Polytechnical St., 29, St. Petersburg, 195251, Russia

The effect of high-intensity focused ultrasound (HIFU) on venous wall structure was studied in the rabbit model. Special setup was developed for ultrasound generation and vessel targeting.

Methods. The essential part of the setup is spherical focusing power irradiator with following characteristics: power

supply voltage of 25 V, frequency of 1.9 MHz, ultrasound intensity in the focal spot $\sim 8.7 \text{ kW/cm}^2$.

Results. Single 15-s exposure of the femoral vein to HIFU resulted in partial desquamation of the endothelium, vacuolization of myocyte cytoplasm, misarrangement and coagulation of collagen fibers. Pulsed HIFU (5 pulses for 5 s each) caused protein coagulation in all layers of venous wall (v. cava posterior) as well as the appearance of the areas of fibrinoid necrosis, severe endothelial desquamation, and intimal detachment. HIFU-induced collagen structural changes in media and adventitia of the vein suggest that HIFU exposure resulted in local temperature increase up to $\sim 60^\circ\text{C}$. In some experiments, adjacent to the vein muscles were also exposed to HIFU. In this case, edema of the interstitium and muscle fibers was registered, as well as fragmentation and coagulation of some fibers, altered staining patterns and neutrophil infiltration. These changes could be attributed to the development of acute muscle injury (acute fasciitis). Perivascular adipose tissue also demonstrated edema and lipolysis, red blood cell diapedesis, and leukocyte infiltration.

Conclusion. The observations on structural changes in the venous wall after HIFU exposure could lay the ground for future experiments on HIFU — mediated obliteration.

Keywords: high intensity focused ultrasound; HIFU-technology; obliteration veins; ultrasonic thermal ablation

For citation. Petrishchev N.N., Tsibin A.U., Semenov D.U., Berkovich A.E., Yukina G.U., Blum N.M., Efimov A.N., Bursian A.A., Senchik K.U. Applying HIFU for the obliteration of the veins in the experiment. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2016; 60(1): 89—93. (in Russian)

For correspondence: Petrishchev N.N., e-mail: lasmed@yandex.ru

Funding. The work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (grant agreement № 14.578.21.0081 from 11.28.2014).

Принципиально новым подходом к лечению ряда болезней можно рассматривать использование неинвазивного воздействия фокусированного ультразвука высокой интенсивности (ФУВИ), в основе действия которого лежит формирование очага коагуляционного некроза в заданной точке без повреждения прилежащих здоровых тканей и структур, располагающихся по ходу ультразвуковой волны [1,2].

Впервые феномен ультразвуковой термической абляции в качестве метода лечения был описан в 1942 г. [3]. Однако до середины XX века серьезным препятствием для развития данного метода являлось отсутствие надежных средств визуализации наведения. С момента появления первых промышленных установок лишенных вышеназванных недостатков, во многих странах ФУВИ — технология широко применяется, главным образом в онкологии. Ряд исследователей рассматривает ультразвуковую абляцию как перспективный метод лечения варикозной болезни нижних конечностей. Это предположение основано на результатах немногочисленных экспериментальных исследований по применению ФУВИ для индукции тепловой коагуляции стенки сосудов [4—6], однако остаются невыясненными оптимальные режимы воздействия ФУВИ на вены, обеспечивающие их облитерацию.

Цель исследования — изучение влияния фокусированного ультразвука высокой интенсивности (ФУВИ) на структурные компоненты стенки вен.

Методика

Эксперименты выполнены на кроликах породы Шиншилла (масса тела 2,5—3,0 кг). Животные содержались в стандартных условиях вивария. Иссле-

дования проводились в соответствии с правилами лабораторной практики (приказ №267 МЗ РФ от 19.06.2003 г.) и одобрена локальным Этическим комитетом. Для наркоза использовали уретан (Sigma-Aldrich, США), — 2,0 мл/кг 40% раствора уретана внутривенно.

Доступом на бедре выделяли бедренную вену, после средне-срединной лапаротомии — заднюю полую вену. Для визуализации кровотока и ФУВИ воздействия использовали лабораторный стенд, состоящий из ультразвукового блока (УБ), блока управления, устройства позиционирования. УБ включает ультразвуковой диагностический линейный датчик и фокусирующий сферический силовой излучатель. Диагностический датчик, подключенный к ультразвуковому диагностическому аппарату ЭТКС-ДМ-04, обеспечивает наведение фокуса силового излучения на сосуд. Фокусирующий излучатель подключен к выходу высокочастотного генератора, управляемого отдельным программным модулем УЗ аппарата. Устройство позиционирования, снабженное винтовыми подачами и шкалами, обеспечивает контролируемое механическое перемещение по 3 координатам. Акустический контакт между УБ и объектом исследования обеспечивался за счет слоя эхогеля. Органы управления стенда позволяют варьировать длительность и интенсивность силового воздействия. Во всех опытах использовалось напряжение питания генератора силового излучателя 25 В, частота силового излучения 1,9 МГц, интенсивность ультразвука в фокальном пятне составляла приблизительно $8,7 \text{ кВт/см}^2$.

Подвергнутые воздействию ФУВИ участки сосудов с окружающими тканями иссекали для гистологического исследования. Материал обрабатывался по

общепринятым в гистологической практике методикам. Микроскопический анализ проводили на световом микроскопе Leica DM750 (Германия) при увеличении $\times 400$. Фотосъёмку гистологических объектов выполняли, используя цифровую микрофотокамеру ICC50 (Leica, Германия).

Результаты и обсуждение

В 1-й группе опытов (3 кролика) воздействие ФУВИ на бедренные вены производилось однократно в течение 15 с. После этого сосуды выделяли, производили их осмотр и забор материала для гистологического исследования. Кровоток в венах по данным УЗИ после воздействия ФУВИ сохранялся.

Макроскопически облученные участки сосуда выглядели бледными, видимых поверхностных дефектов, перфораций и кровотечений не наблюдалось. При гистологическом исследовании установлены структурные изменения во всех слоях стенки вен.

В интима выявлялись признаки очаговой десквамации эндотелия и участки с сохранённым эндотелием. Субэндотелий отечен, отмечается гомогенизация и уплотнение коллагена, местами его коагуляция. Интима инфильтрирована лейкоцитами. В средней оболочке гладкие миоциты набухшие, наблюдается вакуолизация их цитоплазмы, а также гомогенизация и коагуляция коллагена; в некоторых препаратах — диапедезные кровоизлияния. В адвентиции определяется отечность, разволокнение коллагена, диапедезные кровоизлияния.

В просвете вен, подвергшихся воздействию ФУВИ видны эритроциты, десквамированный эндотелий, в отдельных случаях нити фибрина. Проницаемость вен сохранена, окклюзии не наблюдалось.

В мышцах, прилежащих к вене и попавших в зону воздействия ФУВИ определяется отек стромы и мышечных волокон, признаки фрагментации и коагуляции в части волокон, изменение хромогенности, нейтрофильная инфильтрация стромы. Эти изменения можно оценить как проявление острого повреждения (острый фасциит). В прилегающей к сосудам жировой клетчатке также имеет место отек, липолиз, диапедезные кровоизлияния, лейкоцитарная инфильтрация.

Во 2-й группе (4 кролика) производилось УЗ-воздействие на заднюю полую вену. В одном из экспериментов вена облучалась в течение 25 с при выключенном кровотоке. При гистологическом исследовании установлено, что в вене, эндотелий сосуда полностью десквамирован, субэндотелиальный слой отсутствует. В просвете сосуда видны разрушенные эритроциты, эндотелиоциты и незначительное количество лейкоцитов. Гладкие миоциты средней оболочки непосредственно контактируют с кровью, цито-

плазма гомогенизирована, границ клеток не выявляется. Коллагеновые волокна с признаками коагуляционного некроза. В адвентиции отёк и фрагментация коллагеновых структур.

В следующем эксперименте воздействие ФУВИ на заднюю полую вену (при сохранённом кровотоке) производилось 5 раз по 5 с; в зоне облучения произошел разрыв вены, в месте повреждения морфологический анализ выявил коагуляционные изменения во всех отделах стенки сосуда. Эндотелий и субэндотелиальный слой отсутствуют на всём протяжении. В просвете сосуда наблюдается эффект «запекания» крови. Гладкие миоциты средней оболочки граничат непосредственно с кровью, их цитоплазма гомогенизирована, границ клеток не выявляется. Коллагеновые волокна дезорганизованы, набухшие, местами фрагментированы и слипшиеся. Коллагеновые волокна в адвентициальной оболочке также частично фрагментированы. В структурах стенки вены мозаично выявляются участки фибриноидного некроза.

На расстоянии 1 см от места разрыва стенки вследствие ультразвукового воздействия эндотелий местами отслаивается, клетки отслоившегося пласта сохранены, однако, отмечается вакуолизация цитоплазмы. В субэндотелиальном слое признаки отёка отсутствуют. В просвете сосуда обнаруживаются скудные эритроцитарные массы. В средней оболочке участки повреждения располагаются мозаично, коллагеновые волокна утолщенные, с признаками фибриноидного набухания, гладкие миоциты без изменений. В адвентиции выявляется расширение ваза-вазorum, в зонах повреждения коллагеновые волокна деструктурированы.

В следующих 2 экспериментах воздействие ФУВИ на заднюю полую вену производили через слой жира толщиной около 1 см. Участки вены облучали 5 раз по 5 с. В одной из вен эндотелий большей частью отторгнут, местами эндотелиоциты были набухшими и вакуолизованными. В субэндотелиальном слое отёк не выявлялся. В средней оболочке вены гладкие миоциты также были вакуолизованы, их цитоплазма отёчна, местами границы между клетками отсутствовали. Выявляются набухшие коллагеновые волокна, местами слипшиеся. В адвентиции очагово выявляется деструкция и дезорганизация коллагеновых волокон, видны участки кровоизлияний.

В другом эксперименте морфологический анализ выявил в задней полой вене разрыв стенки с кровоизлиянием в окружающие ткани. В зоне поражения эндотелий отслоен (70% сечения), местами отмечается его вакуолизация. Отёка в субэндотелиальном слое не выявляется. В просвете сосуда видна неизменная кровь, в зоне отторжения интимы отмечается краевое стояние лейкоцитов. В средней оболочке сосуда гладкие миоциты в основном не изменены. Коллагеновые

волокна дезорганизованы, разволокнены, пропитаны кровью. Адвентиция в местах кровоизлияния разрушена, коллагеновые волокна в ней фрагментированы и разволокнены. В окружающей жировой ткани наблюдаются явления дезорганизации и коагуляции соединительнотканых структур.

Таким образом, в наших экспериментах воздействия ФУВИ на вены во всех случаях приводило к десквамации эндотелия и деструктуризации коллагена. Степень выраженности этих изменений зависела от режима облучения.

Коллаген, как известно, является важнейшим компонентом стенки вен, особенно средней оболочки и адвентиции. Структурные изменения коллагена возникают при нагревании его выше 54°C. Нагрев коллагена до 60—69°C приводит к денатурации и деструктуризации (разволокненность, разрывы волокон, «спайка» волокон и т.д.) [5,9]. При нагреве выше 69°C коллаген подвергается сжатию вплоть до 60% от первоначальной длины. При этом стенка вены становится менее эластичной, жесткой, хрупкой и склонной к разрывам. Максимальное сжатие коллагена происходит в первые секунды нагрева [7, 10].

Полученные нами данные указывают на то, что примененная технология воздействия ФУВИ обеспечивает повышение температуры в зоне облучения около 60°C, что достаточно для денатурации коллагена. В некоторых опытах ФУВИ вызвало, по видимому, еще большее повышение температуры, что приводило к коагуляции структурных компонентов сосудистой стенки и ее разрыву.

В механизме окклюзии и облитерации вен большое значение имеет активация системы гемостаза в ответ на повреждение эндотелия. Во всех экспериментах после воздействия ФУВИ мы наблюдали те или иные изменения эндотелиоцитов: вакуолизация цитоплазмы, набухание, десквамация. В некоторых случаях структурные изменения были столь значительны, что средняя оболочка вен контактировала непосредственно с кровью. Вместе с тем, случаев пристеночного или обтурирующего тромбоза вен мы не выявили. Возможно, это объясняется тем, что исследование вен производилось в ближайшее время после воздействия ФУВИ (тромбы могли образоваться позже), а также тем, что тепловое воздействие снижает агрегационную и адгезивную активность тромбоцитов [8]. Можно предположить, что повреждение эндотелия под воздействием ФУВИ приведет к более быстрой инициации тромбоза вен в том случае, когда денатурация коллагена и жесткость сосудистой стенки будет менее выражена и, следовательно, менее ограничены возможности вазопазма, способствующего тромбозу.

Дальнейшее совершенствование технологии воздействия ФУВИ на вены должно быть направлено на

то, чтобы минимизировать повреждение коллагена и добиться того, чтобы эпицентром действия ФУВИ был эндотелий. Достичь этой цели можно за счет совершенствования процесса фокусирования.

Заключение

Воздействие фокусированного ультразвука высокой интенсивности на вены вызывает структурные изменения в их стенке, которые можно рассматривать как основу последующей облитерации. Использование ФУВИ-технологии при венозной недостаточности нижних конечностей человека особенно актуально при несостоятельности коммуникантных вен (горизонтальный рефлюкс). Особенностью ФУВИ-технологии является неинвазивность и минимальное повреждение тканей окружающих сосуды.

References

1. Clarke R.L., ter Haar G.R. Temperature rise recorded during lesion formation by high-intensity focused ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* 1997; 23: 299-306.
2. Cline H.E., Schenck J.F., Hynynen K. et al. MR-guided focused ultrasound surgery. *J. Comput. Assist. Tomogr.* 1992; 16: 956-65.
3. Lynn J.G., Zwemer R.L., Chick A.J., Miller A.E. A new method for the generation and use of focused ultrasound in experimental biology. *J. Gen. Physiol.* 1942; 26: 179-93.
4. Delon-Martin C., Vogt C., Chignier E., Guers C., Chapelon J.Y., Cathignol D. Venous thrombosis generation by means of high-intensity focused ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* 1995; 21: 113-9.
5. Henderson P.W., Lewis G.K., Shaikh N. et al. Aportable high-intensity focused ultrasound device for noninvasive venous ablation. *J. Vasc. Surg.* 2010; 51: 707-11.
6. Hwang J. H., Zhou Y., Warren C. et al. Targeted Venous Occlusion Using Pulsed High-Intensity Focused Ultrasound. *IEEE transactions on biomedical engineering.* 2010; 57: 1653-8.
7. Martin R.W., Vaezy S., Kaczkowski P. et al. Hemostasis of punctured vessels using Doppler-guided high-intensity ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* 1999; 25: 985-90.
8. Rao G.H., Smith 2nd C.M., Escobar G., White J.G. Influence of heat on platelet biochemistry, structure, and function. *J. Lab. Clin. Med.* 1993; 122: 455-64.
9. Tokarczyk A., Rivens I., van Bavel E. et al. An experimental system for the study of ultrasound exposure of isolated blood. *Phys. Med. Biol.* 2013; 58: 2281-304.
10. Shaw C.J., ter Haar G.R., Rivens I.H., Giussani D.A., Lees C.C. Pathophysiological mechanisms of high-intensity focused ultrasound-mediated vascular occlusion and relevance to non-invasive fetal surgery. *Journal of The Royal Society Interface.* 2014; 26, 11 (95):20140029.doi:10/1098.rsif.2014/0029

Поступила 20.11.15

Сведения об авторах:

Цибин Андрей Юрьевич, канд. мед. наук, доцент каф. общей хирургии ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, e-mail: autsibin@yandex.ru

Семенов Дмитрий Юрьевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. общей хирургии ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, e-mail: Semenov_du@mail.ru

Беркович Александр Ефимович, зав. лаб. «Медицинская ультразвуковая аппаратура» ФГАОУ ВО «СПбПУ», e-mail: aerberkovich@yandex.ru

Юкина Галина Юрьевна, канд. мед. наук, зав. лабораторией патоморфологии НИЦ ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, e-mail: ripson@inbox.ru

Блюм Наталья Михайловна, науч. сотр. лаб. патоморфологии НИЦ ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, e-mail: blumn@mail.ru

Ефимов Андрей Николаевич, канд. мед. наук, доцент каф. клинической анатомии и оперативной хирургии ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, e-mail: efiand@yandex.ru

Бурсиан Андрей Арнольдович, гл. конструктор лаб. «Медицинская ультразвуковая аппаратура» ФГАОУ ВО «СПбПУ», e-mail: bursian@mail.ru

Сенчик Константин Юрьевич, доктор мед. наук, проф., консультант лаб. «Медицинская ультразвуковая аппаратура» ФГАОУ ВО «СПбПУ»

Иванов Ю.Д.^{1,3}, Мальсагова К.А.¹, Плешакова Т.О.¹, Шумов И.Д.¹, Кайшева А.Л.¹,
Попов В.П.², Наумова О.В.², Фомин Б.И.², Насимов Д.А.², Латышев А.В.²,
Асеев А.Л.², Татур В.Ю.³, Иванова Н.Д.⁴, Коновалова Г.М.⁵, Арчаков А.И.¹

Регистрация белка в сыворотке крови с помощью биосенсора на базе полевого нанотранзистора

- ¹ — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», Москва
² — ФГБУН «Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова» Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск
³ — Общество с ограниченной ответственностью «ЦАМАКС», Москва
⁴ — Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА им. К.И. Скрябина, Москва
⁵ — Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Сочинский государственный университет, Сочи

Разработан метод детекции белка *D-NFATc1*, связанного с онкологическими заболеваниями, в сыворотке крови с помощью нанопроводного биосенсора (НПБ) на основе полевых нанотранзисторов. Полевой нанотранзистор был создан на базе структур «кремний-на-изоляторе». Для биоспецифической детекции определяемого белка поверхность нанопроволок (НП) была модифицирована аптамерами против определяемого белка. Использование НП с шириной 3 мкм позволило получить стабильные сток-затворные характеристики (СЗХ) и зарегистрировать *D-NFATc1* в сыворотке крови при концентрации $2,5 \times 10^{-14}$ М в режиме измерения СЗХ. Сбор данных в режиме снятия СЗХ НП производился с помощью высокоскоростной системы сбора данных под управлением ПО ТУРБО НБС.

Ключевые слова: полевой транзистор; детекция белка; биосенсор

Для цитирования: Иванов Ю.Д., Мальсагова К.А., Плешакова Т.О., Шумов И.Д., Кайшева А.Л., Попов В.П., Наумова О.В., Фомин Б.И., Насимов Д.А., Латышев А.В., Асеев А.Л., Татур В.Ю., Иванова Н.Д., Коновалова Г.М., Арчаков А.И. Регистрация белка в сыворотке крови с помощью биосенсора на базе полевого нанотранзистора. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016; 60(1): 94–98.

Работа была выполнена при поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (соглашение № 14.576.21.0074, уникальный идентификатор проекта — RFMEFI57614X0074).

Ivanov Yu.D.^{1,3}, Malsagova K.A.¹, Pleshakova T.O.¹, Shumov I.D.¹, Kaysheva A.L.¹,
Popov V.P.², Naumova O.V.², Fomin B.I.², Nasimov D.A.², Latyshev A.V.²,
Aseev A.L.², Tatur V.Yu.³, Ivanova N.D.⁴, Konovalova G.M.⁵, Archakov A.I.¹

Registration of the protein in the serum with a field-effect nanotransistor biosensor

- ¹ — Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia
² — Institute of Semiconductor Physics, SB RAS, Novosibirsk, Russia
³ — TSAMAX Ltd., Moscow, Russia
⁴ — Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia
⁵ — Sochi State University, Sochi, Russia

A method for detection of cancer-associated protein *D-NFATc1* in serum using nanowire (NW) biosensor based on field-effect nanotransistor is developed. Field-effect nanotransistor was fabricated on the basis of «silicon-on-insulator» structures. For the biospecific detection of target protein, the NW surface was modified with aptamers against the target protein. Using the 3 μm-NW enabled to obtain stable source-drain characteristics and to register *D-NFATc1* in serum at concentration of 2.5×10^{-14} M in the mode of drain-source current vs. gate voltage characteristics measurements. Data collection in the mode of drain-source current vs. gate voltage characteristics measurements was carried out with the use of high-speed data collection system running TURBO NBS software.

Keywords: the field transistor; detection of albumen; biologysensor

For citation: Ivanov Yu.D., Malsagova K.A., Pleshakova T.O., Shumov I.D., Kaysheva A.L., Popov V.P., Naumova O.V., Fomin B.I., Nasimov D.A., Latyshev A.V., Aseev A.L., Tatur V.Yu., Ivanova N.D.,

Konovalova G.M., Archakov A.I. Registration of the protein in the serum with a field-effect nanotransistor biosensor. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2016; 60(1): 94–98. (in Russian)

For correspondence: Ivanov Yu.D., e-mail: yurii.ivanov@rambler.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Актуальность разработки быстродействующих высокочувствительных биосенсоров нового поколения обусловлена необходимостью обнаружения белковых маркеров заболеваний человека в биологических жидкостях при сверхнизких концентрациях ($<10^{-13}$ М), когда патологический процесс находится на ранней стадии развития [1]. Одним из основных факторов, определяющих высокую чувствительность новых диагностических устройств, является использование миниатюрных сенсорных элементов, размеры которых соизмеримы с размерами молекул определяемых белков [2]. К такому типу устройств относятся нанопроводные биосенсоры (НПБ) на базе полевых нанотранзисторов, позволяющие детектировать белки не только с высокой чувствительностью, но и с высоким быстродействием без использования дополнительных меток [3, 4]. Теоретический предел чувствительности НПБ находится на уровне единичных молекул [5].

Специфичность анализа с помощью НПБ достигается за счет использования молекул-зондов, иммобилизованных на поверхность нанопровода (НП). Как правило, в качестве молекул-зондов используются антитела, например [6, 7], или аптамеры [8, 9]. Предпочтительность использования аптамеров (синтетических олигонуклеотидных структур) обусловлена их стабильностью в условиях хранения и анализа, а также низкой стоимостью аптамеров по сравнению с антителами. Ранее нами было экспериментально показано, что белок может быть обнаружен в буферном растворе при концентрации 10^{-15} М с помощью апта-сенсора на основе КНИ-структур [8, 9]. В производстве НП на базе КНИ используется стандартная КМОП-технология, что в перспективе может стать одним из определяющих факторов при серийном производстве НПБ для нужд медицинской диагностики.

Цель исследования — разработка высокочувствительных НПБ с высоким быстродействием (порядка 1 мс на измерение) для детекции белков в сыворотке крови по СЗХ. Поскольку надежность результатов анализа при помощи НПБ в многокомпонентном растворе зависит не только от стабильности молекул-зондов, но и от стабильности свойств самого НП сенсора в биологической жидкости. В настоящей работе были использованы НП сенсоры с шириной 3 мкм, позволяющие получить стабильный сигнал СЗХ при определении белка в сыворотке крови. НПБ включает в себя систему сбора данных (ССД) на базе пикоамперметров под управлением ПО

ТУРБО НБС (Per. № 2015612969 от 27.02.2015 г.). Высокое быстродействие необходимо при массовом скрининге пациентов. Высокое быстродействие нанопроволочного молекулярного детектора (НПБ) было достигнуто за счет использования ПО ТУРБО НБС.

В проведенных нами экспериментах наблюдалась хорошая стабильность СЗХ НП, что позволило использовать его для регистрации белка в сыворотке в реальном времени с высокой чувствительностью и высоким быстродействием. Высокое быстродействие НПБ под управлением ПО ТУРБО НБС достигнуто благодаря тому, что обращение к считывающим сигнал пикоамперметрам осуществляется с помощью стандартных команд SCPI, минуя дополнительные программные оболочки. Также снижается число обращений к прибору за счет предварительного накопления данных в буфере обмена пикоамперметра. Определяемым белком, так же как и в [8, 9], является белок D-NFATc1 — ДНК-связывающий домен ядерного фактора активированных Т-клеток, кодируемый геном в составе 18 хромосомы человека. Необходимость обнаружения этого белка в сыворотке крови обусловлена его диагностическим значением: D-NFATc1 является транскрипционным фактором, экспрессия которого повышается в раковых клетках [10]. Результаты исследований показали, что НПБ позволяет обнаружить D-NFATc1 в сыворотке крови при концентрации $2,5 \times 10^{-14}$ М.

Методика

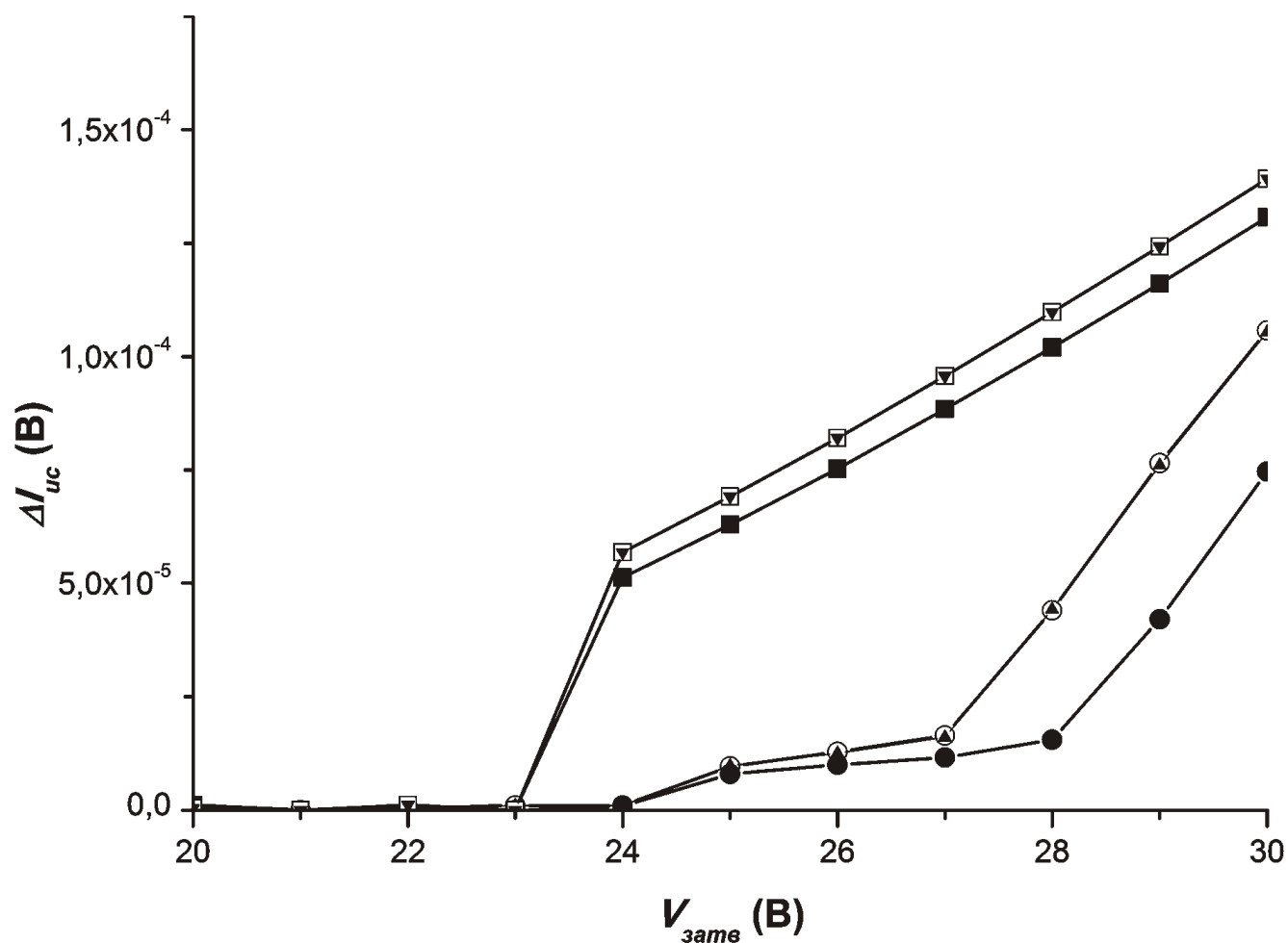
Дитиобис (сукцинимидил пропонат) (DSP) был получен из Pierce (США). Дигидрофосфат калия ($\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$), диметилсульфоксид (DMSO) и 3-аминопропилтриэтоксисилан (APTES) были получены из Sigma-Aldrich (США). Метанол (CH_3OH) был получен из Sigma (США). Пероксид водорода (H_2O_2 , 30% водный раствор), гидроксид калия (KOH) и плавиковая кислота (HF) были получены из Реахим (Россия). Деионизованная вода была получена при помощи системы очистки Milli-Q (Millipore, США).

ДНК-связывающий фрагмент ядерного фактора активированных Т-клеток (D-NFATc1) был любезно предоставлен А.Ю. Рубиной (ИМБ РАН, Москва).

Изготовление НП сенсоров. Конструкция и характеристики НП сенсоров подробно описаны в [7]. Коротко: использованы КНИ-структуры с n-типом проводимости. Толщина отсеченного слоя Si составляла 32 нм, скрытого окисла (buried oxide, BOX) — 300 нм. Ширина НП составляла 3 мкм, толщина 32 нм, длина 10 мкм, число НП на кристалле 12. Схема НПБ детально описана в [7, 8].

Модификация поверхности НП. Поверхность НП сенсоров была обработана по процедуре, подробно описанной нами ранее [7, 8]. Олигонуклеотиды против D-NFATc1 были ковалентно иммобилизованы на силанизированную поверхность рабочих НП с использованием DSP [7, 8].

Приготовление растворов D-NFATc1 в сыворотке. Для приготовления растворов белка в биоматериале использовались образцы сыворотки крови здорового человека, обедненные от 14 мажорных белков с помощью хроматографической колонки Multiple Affinity Removal Column (Hu-14) с размерами 4,6 x 50 мм (Agilent, США) согласно инструкции производителя (<http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5991-3207EN.pdf>). Образец сыворотки разбавлялся в 100 раз калий-фосфатным буфером (КФБ, 1 мМ, pH 7,4). Далее, к 90 мкл буферного раствора сыворотки было добавлено 10 мкл раствора D-NFATc1 (10^8 М, 50 мМ КФБ, pH 7,4). Таким образом, был приготовлен сток-раствор белка в буферном растворе сы-



Зависимости СЗХ НП $\Delta I_{ис}(V_{затв})$, полученные при детекции D-NFATc1 в растворах сыворотки крови с помощью НПБ для рабочих НП с иммобилизованными аптамерами против D-NFATc1 (\circ , \blacktriangle , \bullet — растворы сыворотки в КФБ с $C_{D-NFATc1} = 0$, $C_{D-NFATc1} = 2,5 \times 10^{-15}$ М, $C_{D-NFATc1} = 2,5 \times 10^{-14}$ М соответственно) и для контрольных НП без иммобилизованных аптамеров (\square , ∇ , \blacksquare — растворы сыворотки в КФБ с $C_{D-NFATc1} = 0$, $C_{D-NFATc1} = 2,5 \times 10^{-15}$ М, $C_{D-NFATc1} = 2,5 \times 10^{-14}$ М соответственно). Условия эксперимента: $V_{затв}$ от 0 до +30 В, $V_{ис} = +0,15$ В, $V = 200$ мкл.

воротки (10^9 М D-NFATc1, 1 мМ КФБ, рН 7,4). На основе сток-раствора белка, с помощью последовательного десятикратного разбавления раствором сыворотки, готовились растворы D-NFATc1 для анализа с концентрациями от 10^{13} М до 10^{15} М. Каждый промежуточный раствор выдерживался на шейкере в течение 30 мин при 10°C . Растворы белка готовились непосредственно перед применением. Контрольные эксперименты проводились с использованием раствора сыворотки, не содержащего определяемый белок.

Электрические измерения. Электрические измерения СЗХ полевых нанотранзисторов НПБ проводились с помощью высокоскоростной системы сбора и обработки данных (ССД) под управлением ПО ТУРБО НБС (рег. №2015612969 от 27.02.2015 г.). ССД включала в себя пикоамперметры Keithley 6487 и Keithley 6485 (Keithley, США). Сбор данных в режиме снятия сток-затворных характеристик (СЗХ) и обработка результатов протеомных измерений, полученных с помощью НПБ, осуществлялись в высокопроизводительном режиме (время одного измерения порядка 1 мс с шагом измерения 1 В) при помощи ПО ТУРБО НБС. Во время измерений подложка структур КНИ была использована в качестве управляющего электрода (затвора транзистора). Зависимости тока стока-истока от напряжения на затворе (СЗХ) $\Delta I_{uc}(V_{затв})$ для НП были получены в КФБ (1 мМ, рН 7,4) при $V_{затв}$ от 0 до +30 В и $V_{uc} = 0,15$ В. Для регистрации белка раствор D-NFATc1 (50 мкл в 1 мМ КФБ, рН 7,4) добавлялся в кювету НПБ, содержащую 150 мкл буферного раствора, после чего также снимались СЗХ НП. Для учета неспецифической адсорбции D-NFATc1 на поверхность НП, на поверхности НП сенсора, помимо рабочих НП, присутствовала пара контрольных НП без иммобилизованных аптамеров. В экспериментах использовался буфер с низкой концентрацией соли (1 мМ) для исключения влияния Дебаевского экранирования. При такой концентрации буферных солей радиус Дебая (λ_D) составляет порядка 5 нм, что достаточно, чтобы регистрировать образование белковых комплексов на поверхности НП-структур. Поскольку D-NFATc1 имеет расчетную изоэлектрическую точку $pI = 4,7$ (ExpASy: SIB Bioinformatics Resource Portal), то в условиях эксперимента ($pH = 7,4$) этот белок имеет эффективный отрицательный заряд, и адсорбция отрицательно заряженных молекул на поверхность НП n-типа должна приводить к уменьшению проводимости НП и сдвигу СЗХ вправо.

Результаты и обсуждение

В экспериментах использовались НП сенсоры шириной 3 мкм, что обеспечивало стабильность СЗХ в течение не менее 1 часа. На рисунке представлены полученные зависимости $\Delta I_{uc}(V_{затв})$, полученные при концентрациях D-NFATc1 в сыворотке от $2,5 \times 10^{16}$ до $2,5 \times 10^{14}$ М. Из рисунка видно, что при концентрации $C_{D-NFATc1} = 2,5 \times 10^{14}$ М наблюдается сдвиг СЗХ вправо, т.е. проводимость НП уменьшается. При $C_{D-NFATc1} = 2,5 \times 10^{15}$ М и менее, как и в случае добавления в кювету раствора сыворотки без определяемого белка, сдвиг СЗХ не наблюдался. Таким образом, минимальная детектируемая концентрация молекул D-NFATc1 в сыворотке составила $2,5 \times 10^{14}$ М.

Результаты экспериментов по обнаружению D-NFATc1 путем измерения СЗХ НП показали, что белок может быть зарегистрирован с высокой чувствительностью без использования дополнительных меток. Учитывая, что аптамеры имеют ряд преимуществ перед антителами, то аптасенсоры могут заменить биосенсоры на основе антител для быстрого белкового скрининга и экспресс-диагностики заболеваний. Использование НП сенсоров шириной 3 мкм позволяет достигать высокой стабильности СЗХ при пределе обнаружения белка D-NFATc1 в сыворотке крови порядка 10^{14} М.

References

1. Rissin D.M., Kan Ch.W., Campbell T.G. et al. *Nature Biotech.* 2010; 28: 595-9.
2. Ivanov Y.D., Bukharina N.S., Frantsuzov P.A. et al. *Soft Matter.* 2012; 8: 4602-8.
3. Patolsky F., Zheng G. F., Hayden O. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; V. 101: 14017-22.
4. Zheng G., Patolsky F., Cui Y. et al. *Nature Biotech.* 2005; V. 23: 1294-301.
5. Hahn J., Lieber C.M. *Nano Lett.* 2004; V. 4: 51-4.
6. Pui T.-S., Agarwal A., Ye F. et al. *Nanoscale.* 2009; V. 1: 159-63.
7. Ivanov Yu.D., Pleshakova T.O., Kozlov A.F. et al. *Lab Chip.* 2012; V. 12: 5104-11.
8. Maksagova K.A., Ivanov Yu. D., Pleshakova T. O. et al. *Biomeditsinskaya Khimiya.* 2015; V. 61: 462-7. (In Russian)
9. Ivanov Yu.D., Pleshakova T.O., Kozlov A.F. et al. *Avtometriya.* 2013; V. 49: 119-26. (In Russian)
10. Yiu G.K., Kaunisto A., Chin Y.R., Toker A. *Biochem. J.* 2001; V. 440: 157-66.

Поступила 20.11.15

Сведения об авторах:

Мальсагова Кристина Ахмедовна — аспирант ИБМХ

Плешакова Татьяна Олеговна — кандидат химических наук, старший научный сотрудник ИБМХ

Шумов Иван Дмитриевич — кандидат биологических наук, младший научный сотрудник ИБМХ

Кайшева Анна Леонидовна — кандидат биологических наук, научный сотрудник ИБМХ

Попов Владимир Павлович — доктор физико-математических наук, заведующий лабораторией ИФП СО РАН

Наумова Ольга Викторовна — доктор физико-математических наук, заведующий лабораторией ИФП СО РАН

Фомин Борис Иванович — кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник ИФП СО РАН

Насимов Дмитрий Александрович — научный сотрудник ИФП СО РАН

Латышев Александр Васильевич — член-корреспондент РАН, доктор физико-математических наук, директор ИФП СО РАН

Арчаков Александр Иванович — академик РАН, доктор биологических наук, профессор, научный руководитель ИБМХ

Асеев Александр Леонидович — академик РАН, доктор физико-математических наук, профессор, вице-президент РАН

Татур Вадим Юрьевич — научный консультант ООО «ЦАМАКС»

Коновалова Галина Михайловна — проректор по научной и инновационной деятельности, Сочинский Государственный Университет

Иванова Нина Дмитриевна — преподаватель МВА им. К.И. Скрябина

Иванов Юрий Дмитриевич — доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией ИБМХ, заместитель генерального директора ООО «ЦАМАКС»

Кубышкин А.В.¹, Ломакин Н.В.², Бурячковская Л.И.³, Коваленко Е.П.¹

Новые подходы к исследованию воспаления (Информация о XII Всемирном Конгрессе по воспалению)

¹ — Медицинская академия им. С.И. Георгиевского Крымского федерального университета, Симферополь

² — ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» УДП РФ, Москва

³ — Российский кардиологический научно-производственный комплекс им. Мясникова, Москва

С 8 по 12 августа 2015 года в г. Бостон (Массачусетс, США) состоялся 12-й Всемирный конгресс по воспалению (WCI2015). Конгресс был организован Международной ассоциацией национальных обществ по проблемам воспаления, которая была представлена 10 национальными обществами ведущих стран мира, в том числе и Российским Национальным научным обществом воспаления (<http://www.inflammation.ru/>). В работе конгресса приняли участие более тысячи ученых из разных стран мира.

Программа работы конгресса включала 7 пленарных заседаний и более 40 симпозиумов. В лекциях, прочитанных на пленарных заседаниях, обсуждались наиболее актуальные направления развития научных исследований в области воспаления и возможности использования их результатов в практическом здравоохранении.

Главной целью конгресса было содействие развитию научного взаимодействия между учеными и клиницистами. Программа пленарных заседаний и симпозиумов обеспечивала возможность не только обсуждения последних инновационных достижений в области молекулярных и клеточных механизмов развития воспаления, но и прямого обращения к опыту применения новых противовоспалительных препаратов в клинике.

Следует особо отметить интересные лекции президента конгресса профессора Рода Флауера (Rod Flower, Великобритания) и одного из самых цитируемых исследователей в области воспаления, выпускника Московского университета им. М.В.Ломоносова, профессора Руслана Меджитова (Ruslan Medzhitov, США). Лекция Рода Флауера была посвящена общим проблемам воспаления и ключевым направлениям создания новых противовоспалительных препаратов. В лекции Руслана Меджитова была обоснована роль воспаления в развитии заболеваний различного генеза, в том числе заболеваний метаболической природы, обсуждены механизмы активации воспалительной реакции при различных патологических процессах.

На симпозиумах обсуждался широкий спектр научных проблем в разных направлениях исследования воспалительных процессов. В частности, отдельные симпозиумы были посвящены роли генетических и эпигенетических механизмов в развитии воспаления, роли микроRNA, рецепторов и сигнальных путей, значению ионных каналов и другим молекулярным и генетическим механизмам развития воспаления. Большое внимание было уделено особенностям развития воспаления при метаболических нарушениях, в частности при сахарном диабете и метаболическом синдроме, изучению пусковых механизмов развития воспалительных реакций через Toll-like рецепторы, роли клеточного звена иммунной системы в формировании различных вариантов воспалительной реакции. Отдельные симпозиумы были посвящены обсуждению новых механизмов участия цитокинов, комплемента и эйкозаноидов в развитии воспаления. Среди клеточных механизмов внимание было сосредоточено на изучении нейтрофилов и роли экстрацеллюлярных ловушек (NETs) в функции нейтрофилов при воспалении. Целый ряд симпозиумов был посвящен особенностям развития воспаления при конкретных заболеваниях, таких как остеоартриты и ревматоидный артрит, воспаление органов дыхания, мышечной ткани, аутоиммунные воспалительные процессы, воспалительные заболевания кожи и глаз, роли воспаления при кардиоваскулярной патологии и атеросклерозе, развитии фиброза. Отдельно обсуждались вопросы поиска новых и повышения эффективности использования традиционных маркеров воспаления. На отдельном симпозиуме, и на выставке, организованной в рамках конгресса, были представлены разнообразные экспериментальные модели воспалительных реакций.

Следует подчеркнуть, что программа конгресса была интересна не только исследователям теоретического направления, но и клиницистам, для которых было проведено несколько мастер-классов с алгоритмами лечения ряда сложных заболеваний, в частности псориатического артрита и язвенного колита.

Всеобщее внимание привлекли симпозиумы, посвященные новым терапевтическим подходам, вопросам создания новых противовоспалительных препаратов. На этих симпозиумах были представлены материалы по разработке и применению иммунокорректоров, ингибиторов киназы, различных стимуляторов и ингибиторов сигнальных путей развития воспалительных процессов, газовых трансмиттеров, глюкокортикоидов, обсуждены возможности трансляционной медицины при лечении заболеваний воспалительного генеза. Отдельно обсуждалась роль воспаления в регенеративной медицине, возможности и успехи использования стволовых клеток в процессах репарации.

Российская делегация на конгрессе была представлена семью участниками. Возглавляли делегацию исполнительный директор Национального Научного Общества Воспаления России Никита Ломакин и научный секретарь общества Людмила Бурячковская (Москва) (<http://www.inflammation.ru/>). Российским Национальным Обществом «Воспаления» был организован симпозиум «Терапевтические подходы

при воспалении: новые лица старых друзей», который вызвал неподдельный интерес участников конгресса. Активное участие в конгрессе приняли представители Крыма во главе с профессором Анатолием Кубышкиным, было представлено 3 доклада.

Материалы конгресса опубликованы в журнале общества «Inflammation Research» [1]. Следует подчеркнуть, что многочисленные встречи и дискуссии в рамках конгресса способствовали установлению новых контактов, которые, несомненно, будут полезны для дальнейшего развития новых научных направлений в области изучения воспаления.

Следующий 13-й Всемирный конгресс по воспалению планируется провести в Лондоне (Великобритания) с 8 по 11 июля 2017 года.

References

1. The 12th World Congress on Inflammation. 8–12 August, 2015 Seaport Hotel and World Trade Center, Boston, USA// Inflammation Research. — August 2015, Volume 64. — Supplement 2, pp 51–248