СОДЕРЖАНИЕ

Колонка редактора 4

Гурова Н.А., Спасов А.А., Анисимова В.А.
Антифибрилляторная активность производного имидазобензимидазола соединения РУ-353 5

Дерягин О.Г., Гаврилова С.А., Голубева А.В. и др.
Нейропротекция при ишемическом инсульте: роль АТФ-зависимых калиевых каналов и системы оксида азота 9

Журавский С.Г., Галагудза М.М., Просвирина М.С. и др.
Феномены пре- и посткондиционирования: от старого принципа к новой стратегии терапии 16

Карпов А.А., Успенская Ю.К., Ваулина Д.Д.
Роль мезенхимных стволовых клеток в терапии ишемического повреждения сердца 30

Бульон В.В., Селина Е.Н., Крылова И.Б. и др.
Нейропротекторные эффекты N-фенилалкильного производного таурина при церебральной ишемии у крыс 38

Крылова И.Б., Бульон В.В., Селина Е.Н. и др.
Роль митохондриальных АТФ-зависимых калиевых каналов в механизме антиишемического действия уридина и УМФ при острой ишемии миокарда 44

Малашичева А.Б., Худяков А.А., Костарева А.А.
Значение генетических аномалий в развитии врожденных пороков сердца 49

Нарыжная Н.В., Маслов Л.Н.
Ишемические и реперфузионные повреждения сердца: основные проявления и молекулярный механизм 56

Минуллина И.Р., Дмитриева Р.И., Анисимов С.В. и др.
Функциональные свойства мезенхимных стволовых клеток жировой ткани больных сердечной недостаточностью и коморбидностями 68

Федоров А.В., Костарева А.А.
Современные методы модулирования и визуализации эндогенных микроРНК 77

Щербак Н.С., Бещук О.В., Галагудза М.М. и др.
Влияние ишемического посткондиционирования на уровень проапоптотического белка в нейронах зоны СА1 гиппокампа при глобальной ишемии-реперфузии головного мозга у крыс 82

Щербак Н.С.
Кумулятивные повреждающие эффекты повторных ишемических стимулов на структуры головного мозга 87

ИСТОРИЯ МЕДИЦИНЫ

Журавский С.Г.
Идея предвоздействия в общепатологических и лечебных представлениях С.П. Боткина (к вопросу об истории феномена прекондиционирования) 94

КОЛОНКА РЕДАКТОРА

Глубокоуважаемые коллеги!

Перед вами тематический номер журнала «Бюллетень ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова», посвященный преимущественно экспериментальным и трансляционным исследованиям в медицине. Хорошо известно, что экспериментальные работы закладывают фундамент для разработки новых методов профилактики, диагностики и лечения заболеваний. В последние годы для научного и медицинского сообщества становится все более очевидным, что путь от лабораторного открытия до постели пациента зачастую является неоправданно долгим и извилистым. Требуется ускорение процесса внедрения (трансляции) новых технологий в рутинную клиническую практику при условии их максимальной безопасности для пациентов. Большинство публикаций, вошедших в данный номер журнала, носят трансляционный характер. В номере содержится исторический очерк, посвященный 180-летию с рождения С.П. Боткина. В ряде обзорных и оригинальных статей рассматриваются новые аспекты таких эндогенных способов цитопротекции, как пре- и посткондиционирование. Значительное количество публикаций посвящено перспективам клеточной терапии социально значимых заболеваний, а также поиску и валидации новых биомаркеров. Хочется надеяться, что опубликованные материалы будут интересны как ученым-экспериментаторам, так и практикующим врачам.

С уважением,
члены редколлегии журнала

Директор Института молекулярной биологии и генетики
ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ,
А.А. Костарева

Директор Института экспериментальной медицины,
ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ,
М.М. Галагудза

АНТИФИБРИЛЛЯТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНОГО ИМИДАЗОБЕНЗИМИДАЗОЛА СОЕДИНЕНИЯ РУ-353

Н.А. Гурова[1], А.А. Спасов[1], В.А. Анисимова[2]

[1] ГБОУ ВПО Волгоградский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России, Волгоград, Россия
[2] НИИ физико-органической химии Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия

Гурова Наталия Алексеевна – кандидат медицинских наук, старший преподаватель, докторант кафедры фармакологии ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития РФ; *Спасов Александр Алексеевич* – академик РАМН, Заслуженный доктор наук РФ, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России; *Анисимова Вера Алексеевна* – кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник НИИ физико-органической химии Южного федерального университета.

Контактная информация: ГБОУ ВПО Волгоградский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития РФ, пл. Павших борцов, 1, Волгоград, Россия, 400131. E-mail: gurova.vlgmed@mail.ru (Гурова Наталия Алексеевна).

Резюме.

В экспериментах на кошках было установлено, что новое производное бензимидазола соединение РУ-353 оказывало выраженные антифибрилляторные свойства. Оно повышало порог электрических фибрилляций желудочков сердца в большей степени, чем лидокаин, и превосходило его как по абсолютной величине эффекта, так и по величине терапевтического индекса. По продолжительности антифибрилляторного эффекта исследуемое соединение достоверно превосходило препарат сравнения в 2 раза. Способность РУ-353 уменьшать максимально воспроизводимую частоту сердечных сокращений желудочков свидетельствует о возможном увеличении рефрактерного периода миокарда. Можно предположить, что соединение РУ-353 увеличивает продолжительность потенциала действия. Способность увеличивать порог электрических фибрилляций является одним из отличительных свойств кордароноподобных препаратов.

Ключевые слова: экспериментальные нарушения ритма, фибрилляции желудочков, порог фибрилляций, порог навязанного тока, производные имидазобензимидазола.

ANTIFIBRILLATORY EFFECTS OF IMIDAZOBENZIMIDAZOLE DERIVATIVE RU-353

Gurova N.A.[1], Spasov A.A.[1], Anisimova V.A.[2]

[1] Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia
[2] Institute for Physical and Organic Chemistry of the Southern Federal University, Rostov on Don, Russia

Corresponding author: Volgograd State Medical University, Pavshikh Bortsov Sq. 1, Volgograd, Russia, 400131. E-mail: gurova.vlgmed@mail.ru (Natalia A. Gurova – PhD, Senior Tutor, Department for Pharmacology of Volgograd State Medical University).

Abstract.

Novel imidazobenzimidazole derivative RU-353 has demonstrated the pronounced antifibrillatory effect in cats. RU-353 enhanced the threshold of left ventricle fibrillations more effectively compared to lidocaine considering total effect and therapevtic index. Duration of antifibrillatory action was twofold longer in group treated by RU 353 in comparison to lidocaine. Capability of RU-353 to decrease maximal reproducible ventricular rate is the evidence of possible prolongation of myocardial refractory period. RU-353 is suggested to prolong action potential. The capability to enhance the threshold of electrical fibrillations is distinctive feature of cordaron-like agents.

Key words: experimental arrhythmias, threshold of fibrillations, ventricular fibrillations, threshold of imposed current, imidazobenzimidazol derivatives.

Статья поступила в редакцию 28.09.2012, принята к печати 01.10.2012.

Введение

Вопрос о создании новых антиаритмических препаратов остается открытым, поскольку существующие препараты, в том числе и III класса не достаточно эффективны и оказывают выраженные побочные действия [1–4].

Проблема антиаритмической терапии у пациентов, с высоким риском внезапной смерти, требует поиска соединений с высокой антифибрилляторной активностью. Попытки создания антиаритмических препаратов III класса новой генерации – так называемых «чистых» (высокоселективных) блокаторов выходящих калиевых токов (таких как, d-соталол, сематилид, дофетилид, алмокалант, ибутилид, нибентан и др.) не дали позитивных результатов. Хотя, во многочисленных исследованиях показана высокая купирующая и профилактическая активность "чистых" (высокоселективных) антиаритмиков III класса, однако частота развития проаритмических эффектов оказалась более высокая, чем у неселективных препаратов [3]. Кроме того, в условиях ишемии миокарда порог фибрилляций снижается, а многие антиаритмические препараты, введенные на фоне ишемии увеличивают риск профибрилляторного действия [5–7].

Поиск препаратов с антифибрилляторными свойствами является очень важным для антиаритмических препаратов третьего класса.

В настоящее время накоплен опыт изучения кардиотропной активности замещенных гетероциклических азотосодержащих систем [8–13].

Нами было изучено производное имидазобензимидазола соединение РУ-353. В ранее проведенных исследованиях было показано, что оно уменьшает возбудимость изолированного предсердия, что является косвенным показателем удлинения эффективного рефрактерного периода миокарда; увеличивает рефрактерность миокарда (удлинение интервала QT_c); при изучении влияния на трансмембранные ионные токи трабекул предсердий лягушки выявлены выраженное дозозависимое блокирующее влияние на токи калия и незначительный угнетающий эффект в больших дозах на токи натрия и кальция [14]. Данные свойства свидетельствуют о способности соединения РУ-353 увеличивать потенциал действия, что дает нам возможность предположить наличие у него эффектов препаратов III класса.

Целью настоящего исследования явилось изучение антифибрилляторных свойств данного соединения.

Материалы и методы

Методы. Для изучения антифибрилляторной активности соединения РУ-353 были использованы экспериментальные модели по определению максимально воспроизводимой частоты и порога фибрилляций желудочков. Исследования проводились на 20 кошках, массой 2,0–4,5 кг, наркотизированных этаминалом натрия (50 мг/кг, внутрибрюшинно) в условиях искусственной вентиляции легких, торакотомии и перекардотомии.

«Эктопический очаг» возбуждения создавали электрической стимуляцией с помощью подшитых к левому желудочку игольчатых электродов (электростимулятор ЭС-50-01, Россия).

Порог фибрилляций определяли повторным сканированием уязвимого периода из 90 прямоугольных импульсов постоянного тока длительностью 4 мс и увеличивающейся интенсивности (частота 50 Гц) до тех пор, пока не возникала фибрилляция желудочков. Дефибрилляцию производили с помощью дефибриллирующего разряда заданной активности, создаваемого непосредственно на миокард от дефибриллятора ДИ-03 (Россия). Величину порога оценивали как минимальную интенсивность тока в миллиамперах, при которой возникала фибрилляция.

В этой же серии экспериментов определялся ***порог навязанного тока***. На миокард через игольчатые электроды подавались прямоугольные импульсы постоянного тока длительностью 4 мс пороговой силы тока (порог навязанного ритма) и увеличивающейся частотой. За пороговую величину принимали ту частоту, при которой происходил срыв навязанного ритма и желудочки начинали сокращаться в своем ритме.

Усвоение сердцем навязанного ритма определяли по ЭКГ во втором стандартном отведении (компьютерный электрокардиограф «Поли-Спектр 8/В», «Нейрософт», Россия), снижению артериального давления (электроманометр на механотронных датчиках с помощью компьютерного гемодинамического анализатора на базе программы BEAT (Москва, Россия).

Соединение РУ-353 вводилось внутривенно однократно в дозах 1,0; 1,7; 3,0 мг/кг в эквивалентных объемах. Препаратом сравнения выбран лидокаин в дозе 5,0 мг/кг, как один из рекомендованных для купирования фибрилляций желудочков [15]. Все параметры определялись до и через 15, 30, 60, 90 минут после введения веществ.

Ранее для вычисления широты терапевтического действия соединения РУ-353 была определена острая токсичность на крысах при внутривенном введении, которая составила 17,0 мг/кг [14].

Эксперименты проводились в соответствии с Правилами и рекомендациями к проведению экспериментальных исследований. Все эксперименты были выполнены согласно методическим руководствам и нормативным документам (ГОСТ З 51000.3-96 и 51000.4-96; правила и Международные рекомендации Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997); правила лабораторной практики (GLP) в Российской Федерации, утвержденные приказом Минздрава РФ от 19 июня 2003 г. № 267). Забой животных проводился согласно требованиям, изложенным в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1997).

Список использованного программного обеспечения. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0. (*StatSoft*, США) и Excel 2007 (*MS* Office XP, США). Проводился расчет базовых статистических показателей, характеризующих вариационные ряды (среднее арифметическое значение M, стандартная ошибка средней арифметической m). Результаты исследований оценивали с использованием двухвостового *t*-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони ($p < 0,05$) и непараметрического критерия Манна-Уитни.

Материалы. Субстанция РУ-353 (НИИ ФОХ ЮФУ, г. Ростов-на-Дону, Россия); лидокаин 2% раствора для инъекций («Мосхимфармпрепараты», Россия).

Результаты

В экспериментах по влиянию на **максимально воспроизводимую частоту и порог фибрилляций желудочков п**ри стимуляции раздражения в эктопическом очаге, превышающего исходную частоту возбуждения синусового узла, на электрокардиограмме последовательно возникают единичные, групповые экстрасистолы и, наконец, фибрилляции желудочков.

При определении порога фибрилляций желудочков было установлено, что у животных до введения исследуемого соединения он был от 1,9 mA до 2,8 mA, и оставался на одном уровне в течении 2 часов.

Соединение РУ-353 проявило выраженные антифибрилляторные свойства. Для возникновения фибрилляций желудочков после введения исследуемого соединения требовалась значительно большая интенсивность электрического раздражения, чем до введения. Соединение РУ-353 в диапазоне доз (1,0; 1,7 и 3,0 мг/кг) статистически достоверно повышало порог электрических фибрилляций желудочков в 6,5; 5,4 и 20,7 раз соответственно (табл. 1, рис. 1). Повышение порога фибрилляций отмечалось в течении 15–60 минут (в зависимости от вводимой дозы). Препарат сравнения – лидокаин – увеличивал порог электрических фибрилляций желудочков в 6,9 раза в течение 15 минут.

Проведен сравнительный анализ эффективности соединения РУ-353 и лидокаина относительно $ЛД_{50}$ при внутривенном введении. По данными [16] $ЛД_{50}$ лидокаина у крыс при внутривенном введении составляет 25 мг кг. Установлено, что РУ-353 в дозе 1,0 мг/кг (1/17 $ЛД_{50}$) оказывает на порог электрических фибрилляций эффект, подобный лидокаину в дозе 5,0 мг/кг (1/5 $ЛД_{50}$). В дозах, эквивалентных 1/5–1/6 $ЛД_{50}$, исследуемое соединение превосходило препарат сравнения как по абсолютной величине повышения порога электрических фибрилляций в 3 раза, так и по длительности антифибрилляторного эффекта в 3–4 раза.

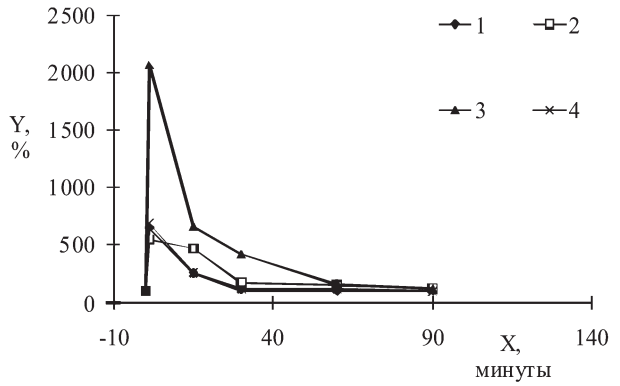


Рис. 1. Влияние соединения РУ-353 и лидокаина на порог электрических фибрилляций желудочков наркотизированных кошек (дельта %).
Обозначения: при внутривенном введении соединения РУ-353 в дозе 1,0 (1), 1,7 (2), 3,0 (3) мг/кг и лидокаина в дозе 5,0 (4) мг/кг внутривенно

Соединение РУ-353 во всех дозах статистически достоверно снижало максимально воспроизводимую частоту сердцебиений (табл. 2) – то есть подавляло эктопический водитель ритма – в течение 30 минут. Максимальное влияние соединения отмечалось на первой минуте в дозе 3,0 мг/кг, когда произошло снижение максимально воспроизводимой частоты сокращений на 40%.

Эффект лидокаина продлился 15 минут, максимально снижение изучаемого показателя было на первой минуте и составило 36%. Несмотря на примерно одинаковую силу действия лидокаина и РУ-353, эффект второго был более длительным (в 2 раза).

Заключение

Проведенные исследования показали, что соединение РУ-353 проявляет выраженные антифибрилляторные свойства. Оно повышает порог электрических фибрил-

Таблица 1

Влияние соединения РУ-353 и лидокаина на порог электрических фибрилляций желудочков наркотизированных кошек (абсолютные данные)

№	Вещество	Доза, мг/кг	Исход, mA	Время (минуты) и порог фибрилляций (mA)				
				1 мин	15 мин	30 мин	60 мин	90 мин
	РУ-353	1,0	2,10 ± 0,14	13,05 ± 0,94*	5,46 ± 0,42*	2,31 ± 0,41	2,10 ± 0,23	2,10 ± 0,23
		1,7	2,30 ± 0,50	26,47 ± 1,85*#	22,68 ± 2,37*#	8,42 ± 1,12*#	7,24 ± 0,87*#	6,00 ± 1,25#
		3,0	1,90 ± 0,16	39,33 ± 4,95*#	12,54 ± 2,47*#	7,98 ± 1,5*#	2,85 ± 0,23*	2,47 ± 0,21
	Лидокаин	5,0	1,90 ± 0,21	13,11 ± 1,72*	4,94 ± 0,96*	2,28 ± 0,10	2,34 ± 0,28	1,9 ± 0,28

* – различия статистически значимы по отношению к исходу ($p < 0,05$); # – различия статистически значимы по отношению к лидокаину ($p < 0,05$).

Таблица 2

Влияние соединения РУ-353 и лидокаина на максимально воспроизводимую частоту сердечных сокращений наркотизированных кошек (в Δ % по отношению к контролю)

№	Вещество	Доза, мг/кг, в/в	Время (минуты) и максимально воспроизводимая частота сердечных сокращений (Δ %)				
			1 мин.	15 мин.	30 мин.	60 мин.	90 мин.
	РУ-353	1,0	–23,34 ± 3,36*	–21,32 ± 9,43*	–12,00 ± 2,00*	–5,33 ± 5,33	0,00 ± 0,00
		1,7	–28,37 ± 2,28*	–21,94 ± 2,23*	–13,25 ± 3,26*	–2,23 ± 1,33	0,00 ± 0,00
		3,0	–40,00 ± 9,82*	–23,00 ± 9,84*	–13,96 ± 5,12*	–1,33 ± 1,33	0,00 ± 0,00
	Лидокаин	5,0	–36,00 ± 7,45*	–20,82 ± 6,21*	–8,00 ± 4,62	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

* – различия статистически значимы по отношению к исходу ($p < 0,05$).

ляций желудочков сердца в большей степени, чем лидокаин, и превосходит как по абсолютной величине эффекта, так и относительно $ЛД_{50}$. По продолжительности антифибрилляторного эффекта исследуемое соединение достоверно превосходит препарат сравнения в 2 раза. Можно предположить, что соединение РУ-353 увеличивает продолжительность потенциала действия. Об этом свидетельствует способность уменьшать максимально воспроизводимую частоту сердечных сокращений желудочков за счет увеличения рефрактерного периода миокарда. Повышение порога электрических фибрилляций является одним из отличительных свойств кордаронподобных препаратов и делает перспективным его дальнейшее изучение.

Литература

1. *Гуревич М.А.* Современные аспекты фармакотерапии фибрилляции предсердий // Российский кардиологический журнал. – 2009. – Т. 79, № 5. – С. 95–101.

2. *Кузьмин В.С., Розенштраух Л.В.* Ионные механизмы действия препаратов III класса // Кардиология. – 2010. – № 7. – С. 49–61.

3. *Метелица В.И.* Аритмогенное действие лекарственных средств // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2005. – Т. 68, № 2. – С. 68–77.

4. *Сонин Д.Л., Галагудза М.М., Сыренский А.В., Цырлин В.А.* Кардио- и вазопротекция в профилактике и лечении хронической сердечной недостаточности. Часть II // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2010. – Т. 9, № 1. – С. 4–12.

5. ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the management of patients with atrial fibrillation // Eur. Heart J. – 2006. – № 27. – P. 1979–2030.

6. *Беленков Ю.Н., Мареев В.Ю.* Лечение сердечной недостаточности в XXI веке: достижения, вопросы и уроки доказательной медицины // Кардиология. – 2008. – № 2. – С. 6–16.

7. *Моисеев С.В.* Профилактика внезапной сердечной смерти: мета-анализ рандомизированных контролируемых исследований // Клиническая фармакология и терапия. – 2009. – Т. 18, № 4. – С. 52–56.

8. *Vyas VK, Ghate M.* Substituted benzimidazole derivatives as angiotensin II-AT1 receptor antagonist: a review // Mini Rev. Med. Chem. – 2010. – Vol. 14, № 10. – P. 1366–1384.

9. *Каверина Н.В., Чичканов Г.Г., Цорин И.Б.* Противофибрилляторное действие антиаритмических средств различных классов в условиях активации парасимпатической нервной системы // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2004. – Т. 67, № 6. – С. 30–31.

10. *Турилова А.И., Можаева Т.Я.* Антиаритмические свойства афобазола и других производных 2-меркаптобензимидазола // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т. 73, № 5. – С. 8–11.

11. *Петров В.И., Спасов А.А., Анисимова В.А., Кириллов О.В.* Разработка и клиническое исследование нового химического класса антиаритмических средств // Вестник РАМН. – 2003. – № 12. – С. 15–20.

12. *Anisimova V.A., Spasov A.A., Tolpygin I.E. et al.* Synthesis and pharmacological activity of salts of 3-acetyl-2-R-9-dialkylaminoethylimidazo[1,2-a]benzimidazoles // Pharmaceutical chemistry journal. – 2010. – Vol. 44, № 3. – C. 117–122.

13. *Anisimova V.A., Spasov A.A., Tolpygin I.E. et al.* Synthesis and pharmacological activity of 9-R-2-halogenophenilimidazo[1,2-a]benzimidazoles // Pharmaceutical chemistry journal. – 2010. – Vol. 44, № 7. – C. 345–351.

14. Заявка на изобретение RU 2011128941.

15. Скорая медицинская помощь: краткое руководство / Под ред. проф. А.Г. Мирошниченко, проф. В.В. Руксина, доц. В.М. Шайтор. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 312 с.

16. *Lewis, R.J.* Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials. 9th ed. Vol. 1–3. – NY: Van Nostrand Reinhold, 1996. – P. 1148.

НЕЙРОПРОТЕКЦИЯ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ: РОЛЬ АТФ-ЗАВИСИМЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ И СИСТЕМЫ ОКСИДА АЗОТА

О.Г. Дерягин [1], С.А. Гаврилова[1], А.В. Голубева[1], В.В. Андрианов[2, 3], Г.Г. Яфарова[2], Х.Л. Гайнутдинов[2, 3], В.Б. Кошелев[1]

[1] ГУНУ «Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия
[2] ФБГУН Казанский физико-технический институт КазНЦ РАН, Казань, Россия
[3] Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета, Казань, Россия

Дерягин Олег Геннадьевич – соискатель, кафедра физиологии и общей патологии ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова; *Гаврилова Светлана Анатольевна* – кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии и общей патологии ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова; *Голубева Анна Валерьевна* – кандидат биологических наук, ассистент кафедры физиологии и общей патологии ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова; *Андрианов Вячеслав Вадимович* – кандидат биологических наук старший научный сотрудник кафедры зоологии беспозвоночных КФУ; *Яфарова Гузель Гулюсовна* – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории спиновой физики и спиновой химии КФТИ КазНЦ РАН; *Гайнутдинов Халил Латыпович* – доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории спиновой физики и спиновой химии КФТИ КазНЦ РАН и ведущий научный сотрудник кафедры зоологии беспозвоночных КФУ; *Кошелев Владимир Борисович* – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии и общей патологии ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова.

Контактная информация: ГУНУ «Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова», Ломоносовский пр-т., дом 31, корп. 5, Москва, Россия, 119192. Тел. +7 (495) 932-88-13. E-mail: olegderyagin@gmail.com (Дерягин Олег Геннадьевич).

Резюме.

Цель. Изучить роль АТФ-зависимых калиевых ($К^+_{АТФ}$) каналов в реализации нейропротекторного эффекта ишемического и фармакологического типов прекондиционирования (ИП и ФП), а также связь между $К^+_{АТФ}$-каналами и системой оксида азота (NO) у крыс с экспериментальным ишемическим инсультом. **Материалы и методы.** Инсульт моделировали на самцах крыс (n = 140) электрокоагуляцией ветви средней мозговой артерии (ОСМА). Использовали неселективные блокатор $К^+_{АТФ}$-каналов глибенкламид и активатор $К^+_{АТФ}$-каналов диазоксид. ИП и ФП выполняли за сутки до ОСМА. Концентрации NO, NO_3^- и NO_2^- оценивали через 5, 9, 24, 72 часа после ОСМА. **Результаты.** ИП уменьшило зону поражения на 37% ($p < 0,05$), а предварительное введение глибенкламида нивелировало действие ИП. Защитный эффект ФП был аналогичен ИП. В 24-часовой точке обнаружили связь между блокадой $К^+_{АТФ}$-каналов и снижением уровня NO_3^- и NO_2^- в сыворотке крови ($p < 0,03$). На третьи сутки в головном мозге животных, получавших глибенкламид, наблюдали подъем уровня NO ($p = 0,0005$). Диазоксид привел к снижению содержания NO в коре головного мозга через 9 и 72 часа после ОСМА ($p = 0,037$ и $p = 0,002$, соответственно). **Выводы.** Нейропротекторный эффект прекондиционирования обусловлен активацией $К^+_{АТФ}$-каналов. Существует зависимость между состоянием $К^+_{АТФ}$-каналов и динамикой изменения уровня NO, и его метаболитов в организме крыс с экспериментальным ишемическим инсультом, которая требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: ишемический инсульт; ишемическая толерантность; феномен прекондиционирования; АТФ-зависимые калиевые каналы; оксид азота.

NEUROPROTECTION IN EXPERIMENTAL ISCHEMIC STROKE: THE ROLE OF ATP-DEPENDENT POTASSIUM CHANNELS AND NITRIC OXIDE SYSTEM

O.G. Deryagin[1], S.A. Gavrilova[1], A.V. Golubeva[1], V.V. Andrianov[2, 3], G.G. Yafarova[2], Kh.L. Gainutdinov[2, 3], V.B. Koshelev[1]

[1] Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
[2] Kazan Physical-Technical Institute of Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia
[3] Institute of Fundamental Medicine and Biology of Kazan Federal University, Kazan, Russia

Corresponding author: Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, 31-5 Lomonosovsky Prospekt, Moscow, Russia, 119192. Phone: +7 (495) 932-88-13. E-mail: olegderyagin@gmail.com (Oleg G. Deryagin – PhD, Department of the General Pathology and Physiology).

Abstract.

Objective. To study the role of ATP-dependent potassium (K^+_{ATP}) channels in realization of neuroprotective effect of ischemic and pharmacological types of preconditioning (IP and PhP) , and the relationship between K^+_{ATP}-channels and nitric oxide (NO) system in rats with experimental ischemic stroke. **Design and methods.** Stroke was modeled in male rats (n = 140) by the electrocoagulation of the middle cerebral artery branch (MCAO). A selective blocker of K^+_{ATP}-channels glibenclamide and an activator of K^+_{ATP}-channels diazoxide were used. IP and PhP were performed one day before MCAO. The concentrations of NO, NO_3^- and NO_2^- were assessed at 5, 9, 24, 72 hours after MCAO. **Results.** IP has reduced the lesion area by 37% ($p < 0.05$), while prior administration of glibenclamide abolished the effect of IP. The protective effect of PhP was similar to IP. There was a link between blockade of K^+_{ATP}-channels and decreased serum levels of NO_3^- and NO_2^- at the 24-h timepoint ($p < 0.03$). On the third day an elevated level of NO has been observed in the brain tissue of rats treated with glibenclamide ($p = 0.0005$). Diazoxide has reduced the NO content in cerebral cortex at 9 and 72 h after MCAO ($p = 0,037$ and $p = 0.002$, respectively). **Conclusions.** Neuroprotective effect of preconditioning is caused by the activation of K^+_{ATP}-channels. A relationship exists between the state of K^+_{ATP}-channels and NO (and its metabolites) level dynamics in rats with experimental ischemic stroke, which requires a further evaluation.

Key words: ischemic stroke; ischemic tolerance; the phenomenon of preconditioning; ATP-dependent potassium channels; nitric oxide.

Статья поступила в редакцию 28.09.2012, принята к печати 01.10.2012.

Введение

Устойчивость мозга к дефициту кровоснабжения может повышаться под действием коротких эпизодов ишемии/реперфузии или гипоксии [1], кратковременной гипотермии [2] и других умеренных стрессорных влияний, способных активировать эндогенные защитные механизмы и повышать устойчивость ткани к последующей тяжелой ишемии [3, 4]. Этот феномен был назван «прекондиционированием».

Активация аденозинтрифосфат-зависимых калиевых ($К^+_{АТФ}$) каналов рассматривается как основной компонент ответа в моделях прекондиционирования [3]. Снижение уровня АТФ во время ишемии способствует открытию $К^+_{АТФ}$-каналов плазматической мембраны, роль которых сводится к восстановлению низкой концентрации ионов Na^+ и Ca^{2+} в цитозоле за счет предотвращения деполяризации. Активация $К^+_{АТФ}$-каналов внутренней мембраны митохондрий связана с предотвращением кальциевой перегрузки митохондрий [5]. Ведущая роль в развитии прекондиционирования отводится митохондриальному пулу [6].

Роль NO в развитии механизмов ишемического повреждения клеток не менее важна. Характер действия NO зависит от интенсивности его продукции, локализации и состояния окружающей ткани. Гиперпродукция NO при ишемическом инсульте вызывает повреждения структурных и регуляторных компонентов клеток [7], а связывание NO с ферментами транспортной цепи митохондрий ингибирует клеточное дыхание [8]. Умеренная активация системы NO во время прекондиционирования может оказывать нейропротекторное действие, активируя ферменты антиоксидантной системы, запуская антиапоптотические механизмы и увеличивая уровень мозгового кровотока [7].

Защитное действие умеренной продукции NO может также быть опосредовано и активацией $К^+_{АТФ}$-каналов [9]. Взаимосвязь между этими звеньями в системе механизмов нейропротекторного эффекта прекондиционирования не доказана в виду отсутствия экспериментальных подходов, четких методов детекции NO и верификации результатов, полученных in vivo. Настоящее исследование посвящено вопросам взаимосвязи между $К^+_{АТФ}$-каналами и системой NO.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на самцах белых беспородных крыс весом 300–500 г (n = 140). Животных содержали в стандартных условиях с регулируемым световым режимом – 12 часов – день, 12 часов – ночь. Исследование проводили в соответствии с требованиями биоэтической комиссии МГУ имени М.В.Ломоносова.

Ишемический инсульт моделировали электрокоагуляцией ветви левой средней мозговой артерии (ОСМА) и подходящей к ней вены с одновременной перевязкой ипсилатеральной сонной артерии под общей анестезией (хлоралгидрат (ХЛГ), 400 мг/кг внутрибрюшинно (в/б)).

В рамках исследования проведено два экспериментальных этапа. На первом этапе изучали влияние блокады $К^+_{АТФ}$-каналов на размер ишемического поражения; защитный эффект отсроченной фазы ИП; и возможность моделирования эффектов прекондиционирования фармакологически, активацией $К^+_{АТФ}$-каналов.

Ишемическое прекондиционирование (ИП) головного мозга выполняли за 24 часа до ОСМА путем попеременного пережатия правой и левой общих сонных артерий на 5 минут с 5-минутной реперфузией в течение 1 часа.

Фармакологическое прекондиционирование (ФП) головного мозга проводили путем введения 10 мкл 6 мМ раствора неселективного активатора $К^+_{АТФ}$-каналов диазоксида (Sigma) в правый боковой желудочек (внутрижелудочковое введение (в/ж)) головного мозга (AP – 1,0 мм, L – 2 мм, V – 4,5 мм) за 24 часа до ОСМА.

Уровень NO_3^- и NO_2^- измеряли в сыворотке венозной крови, взятой у экспериментальных животных за неделю до моделирования фокальной ишемии, затем через 5, 24 и 72 часа после ОСМА. NO_3^- восстанавливали до NO_2^- хлоридом ванадия (III); суммарную концентрацию определяли цветной реакцией Грисса. Оптическую плотность растворов (ОП) измеряли с помощью спектрофотометра Multiskan EX Primary EIA V 2.1-0, $\lambda = 492$ нм.

Размер некроза определяли как % пораженной ткани к размеру коры полушария в срезах мозга толщиной 2,5 мм, окрашенных ТТХ.

Экспериментальные группы:

I серия

ОСМА (n = 10), контроль: 400 мкл/кг ДМСО в/б за 30 минут до ОСМА.

Глиб (n = 9): 20 мг/кг (5 мг/100 мкл ДМСО) глибенкламида (Sigma) в/б за 30 минут до ОСМА.

II серия

ОСМА (n = 10), контроль: 400 мкл/кг ДМСО в/б за 24 часа 30 минут до ОСМА.

ИП (n = 10): 400 мкл/кг ДМСО в/б за 30 минут до ИП, ОСМА через 24 часа после ИП.

ИП + Глиб (n = 10): 20 мг/кг (5 мг/100 мкл ДМСО) глибенкламида в/б за 30 минут до ИП, ОСМА через 24 часа после ИП.

III серия

ОСМА (n = 6), контроль: в/ж введение 5 мкл ДМСО + 5 мкл буферного раствора за 24 часа до ОСМА.

Диаз (n = 7): в/ж введение 10 мкл 6 мМ раствора диазоксида (в 5 мкл ДМСО + 5 мкл буферного раствора) за 24 часа до ОСМА.

На втором этапе изучали влияние блокады и активации $К^+_{АТФ}$-каналов на уровень NO в головном мозге и крови через 5, 9, 24 и 72 часа после ОСМА; каждая временная точка – отдельная группа животных (n = 6).

Измерение содержания NO в тканях мозга и венозной крови выполнено методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Оксид азота улавливали методом спинового захвата [10]. Для этого за 30 мин до забора материала животным вводили компоненты ловушки: 500 мг/кг ДЭТК в объеме 8,4 мл/кг внутрибрюшинно и смесь растворов 37,5 мг/кг $FeSO_4$, 187,5 мг/кг цитрата натрия в общем объеме 6,6 мл/кг подкожно. В результате их взаимодействия внутри организма формируется нерастворимый в воде комплекс ДЭТК-Fe^{2+}, способный присоединять NO с образованием стабильного радикала $(ДЭТК)_2$-Fe^{2+}-NO, который детектируется ЭПР-спектроскопией (спектрометр ER 200E SRC фирмы Брукер в X диапазоне (9.50 GHz) при температуре 77 К) [11]. В тканях мозга регистрировали комплекс иона железа с оксидом азота на основе спиновой ловушки $(ДЭТК)_2$-Fe^{2+}-NO. В образцах венозной крови выявляли два других типа парамагнитных комплексов: комплексы NO с гемом гемоглобина, расположенные в разных плоскостях, R- и T- конформеры.

Экспериментальные группы:

1. Инт (n = 6): интактный контроль.
2. ОСМА (n = 24): контроль с ОСМА.
3. Глиб (n = 24): 20 мг/кг (5 мг/100 мкл ДМСО) глибенкламида в/б за 30 минут до ОСМА.
4. Диаз (n = 24): 10 мг/кг (2,5 мг/100мкл ДМСО) диазоксида в/в за 24 часа до ОСМА.

Статистическую обработку результатов осуществляли при помощи пакетов программ «Excel 2010» и «SPSS 17.0» для Windows. При исследовании взаимосвязей внутри зависимых выборок использовали ранговый коэффициент корреляции по Спирмену. Для сравнения зависимых выборок использовали непараметрический критерий Вилкоксона. При сравнении двух независимых выборок использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (U-критерий) и критерий Фишера. Различия признавались значимыми при допустимой вероятности ошибки меньше 0,05.

Результаты исследования

Роль $К^+_{АТФ}$-каналов в реализации нейропротекторного эффекта ишемического прекондиционировани

Результаты первого этапа исследования представлены в табл. 1. В условиях острой ишемии головного мозга блокада $К^+_{АТФ}$-каналов глибенкламидом (I серия, Глиб) не оказала влияния на размер зоны поражения. ИП, выполненное за 24 часа до ОСМА (II серия, ИП), достоверно уменьшило размер зоны инфаркта на 37%. В группе крыс, получавших глибенкламид (II серия, ИП + Глиб) за 30 минут до ИП размер некроза был сравним с таковым у контрольных животных и статистически значимо выше, чем у крыс с ИП. Активация $К^+_{АТФ}$-каналов диазоксидом за 24 часа до ОСМА (III серия, Диаз) привела к развитию защитного эффекта, аналогичного ИП головного мозга.

Влияния активации и ингибирования $К^+_{АТФ}$-каналов на суммарное содержание NO_3^- и NO_2^- в крови крыс с ишемическим инсультом

Для всех групп наблюдали общую динамику изменения суммарной концентрации NO_3^- и NO_2^- в сыворотке венозной крови (табл. 1): через 5 часов после ОСМА в группах контроля (I и II серии) наблюдали статистически значимый подъем концентрации NO_3^- и NO_2^-; к 24 часам и третьим суткам после моделирования инсульта концентрация приближалась к фоновой, или была ниже фоновых значений (III серия). Анализ межгрупповых различий выявил связь между ингибированием $К^+_{АТФ}$-каналов глибенкламидом за 30 минут или сутки до ОСМА и пониженной концентрацией NO_3^- и NO_2^-, вне зависимости от проведения у них прекондиционирования (I серия, Глиб; II серия, ИП+Глиб). Активация $К^+_{АТФ}$-каналов диазоксидом не повлияла на уровень NO_3^- и NO_2^- в сыворотке крови (III серия, Диаз).

Среди контрольных групп анализ взаимосвязи между суммарной концентрацией метаболитов NO и размером области ишемического поражения выявил обратную корреляцию. Животные с наименьшим размером некроза имели высокий уровень NO_3^- и NO_2^- через 72 часа после ОСМА (rho = –0,556, p = 0,003). Однако у крыс, получавших глибенкламид (группы Глиб и ИП + Глиб), наблюдали прямую зависимость – наибольший размер некроза сопровождался высокими концентрациями NO_3^- и NO_2^- через 24 часа после инсульта (rho = 0,529, p = 0,024). В группах животных с ИП или ФП корреляционный анализ не выявил каких-либо значимых связей.

Влияния активации и ингибирования $К^+_{АТФ}$-каналов на содержание NO в ткани головного мозга и крови крыс с ишемическим инсультом

Динамика изменения содержания гемоглобин-связанного NO крови. В крови контрольной группы крыс

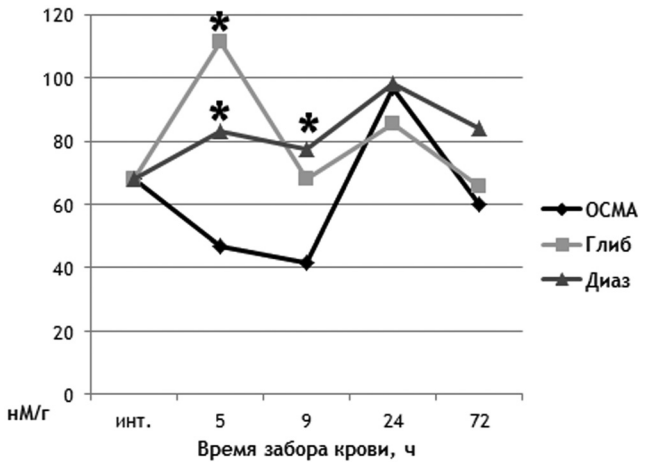


Рис. 1. Динамика изменения содержания R-конформера Hb-NO комплексов в крови крыс с ишемическим инсультом. * – p < 0,05, критерий Манна-Уитни (ОСМА vs. Глиб, 5 ч; ОСМА vs. Диаз, 5 и 9 ч; Глиб vs. Диаз, 5 ч)

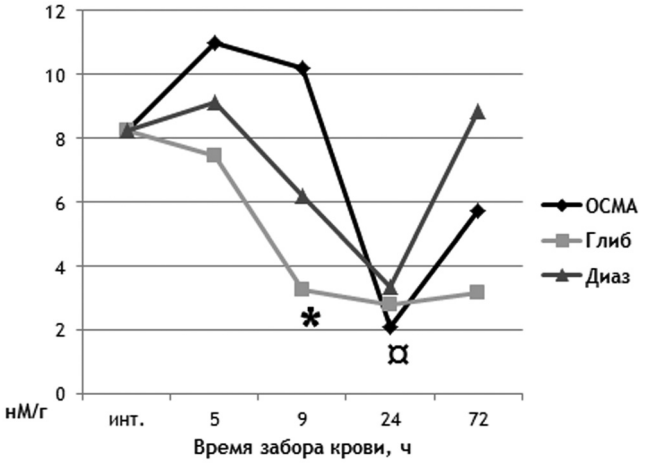


Рис. 2. Динамика изменения содержания T-конформера Hb-NO комплексов в крови крыс с ишемическим инсультом. * – p < 0,05, критерий Манна-Уитни (ОСМА vs. Глиб, 9 ч); ¤ – p < 0,05, критерий Вилкоксона (ОСМА, инт. vs. 24 ч)

с ишемическим инсультом через 24 часа после ОСМА отметили повышение уровня R-конформера Hb-NO комплексов на 42% (рис. 1), статистически значимых отличий от группы интактных животных не выявлено (критерий Манна-Уитни, p = 0,078). У животных, получавших 20 мг/кг глибенкламида в/б за 30 минут до ОСМА содержание R-конформера Hb-NO комплексов через 5 часов после ОСМА было на 137% выше значений контрольной группы (критерий Манна-Уитни, p = 0,004). Подобное наблюдали у крыс, получавших 10 мг/кг диазоксида в/в за 24 часа до ОСМА – значения отличались от контрольных на 78% через 5 часов и 87% через 9 часов после ОСМА (критерий Манна-Уитни, p = 0,004 и p = 0?006, соответственно), однако повышение было менее выраженным, чем в группе Глиб (критерий Манна-Уитни, p = 0,037).

Для T-конформера Hb-NO комплексов в крови контрольных животных наблюдали обратную ситуацию (рис. 2) – через 24 часа после ОСМА уровень был на 75% меньше, чем у интактных животных (критерий Вилкоксона, p = 0,043). В группе Глиб содержание T-конформера Hb-NO комплексов через 9 часов после инсульта уменьшилось на 68% по сравнению с контрольной группой (критерий Манна-Уитни, p = 0,028).

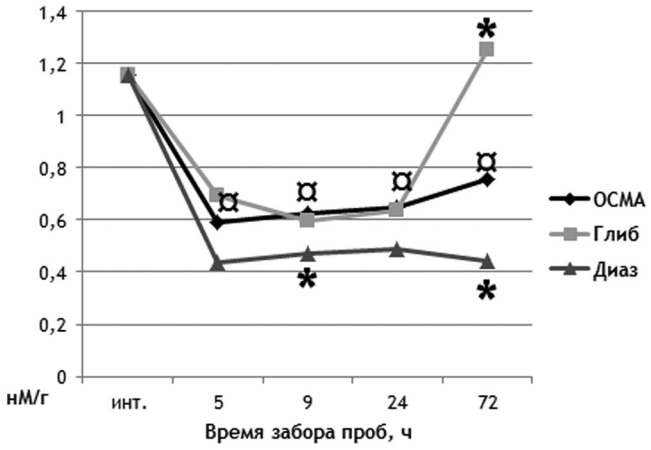


Рис. 3. Динамика изменения содержания свободного NO в корковых структурах головного мозга крыс с ишемическим инсультом. * – p < 0,05, критерий Манна-Уитни (ОСМА vs. Глиб, 72 ч; ОСМА vs. Диаз, 9 и 72ч); ¤ – p < 0,002, критерий Вилкоксона (ОСМА, инт. vs. 5, 9, 24 и 72 ч)

Динамика изменения содержания свободного NO ткани головного мозга. Содержание NO в корковых структурах головного мозга в контрольной группе крыс с ишемическим инсультом было почти в два раза меньше, чем у интактных животных во всех временных точках (критерий Вилкоксона, p < 0,002, рис. 3). В группе животных, получавших глибенкламид, на третьи сутки после операции наблюдали увеличение уровня NO на 65% по сравнению с контролем (критерий Манна-Уитни, p = 0,0005). Введение диазоксида за сутки до ОСМА привело к снижению уровня NO во всех временных точках на 25–41%, статистически значимые отличия от контроля выявлены для проб, взятых через 9 и 72 часа после ОСМА (критерий Манна-Уитни, p = 0,037 и p = 0,002, соответственно). Диазоксид не изменял уровень NO относительно контрольной группы в ишемизированной области коры.

Обсуждение

Обсуждение дизайна исследования. В качестве наркоза использовали хлоралгидрат – снотворный препарат алифатического ряда с продолжительным действием. Этот наркоз не обладает нейропротекторным действием и позволяет адекватно оценить влияние исследуемых препаратов на размер поражения.

Использованная модель ишемического инсульта у крыс была выбрана благодаря ее высокой воспроизводимости. Высота коагуляции СМА подобрана так, чтобы некроз развивался преимущественно в лобно-теменной части коры, не затрагивая при этом подкорковые структуры, что позволяет избежать осложнений со стороны висцеральных функций и гибели животных. Одновременная коагуляция подходящей к СМА вены и перевязка ипсилатеральной сонной артерии стабилизирует размер зоны ишемии, что также позволяет уменьшить число используемых в эксперименте животных.

В работе использовали блокатор $K^+_{АТФ}$-каналов плазматической мембраны и митохондриальных $K^+_{АТФ}$-каналов глибенкламид, в дозе 20 мг/кг, и активатор тех же типов каналов диазоксид, в дозе 10 мг/кг для в/в введения и 10 мкл 6 мМ раствора для введения в боковой желудочек

мозга крысы. Для в/б и в/в введения оба препарата были растворены в ДМСО. Дозы и время инъекции подобраны на основе данных литературы [12–14]. Выбор неселективных препаратов обусловлен тем, что в условиях ишемии в клетках активируются оба типа $К^+_{АТФ}$-каналов. Мы сделали предположение, что на активность различных видов NO-синтазы может оказывать влияние в первую очередь состояние $К^+_{АТФ}$-каналов плазматической мембраны. В то время как на состояние нитритредуктазных систем митохондрий и митохондриальной NO-синтазы – состояние митохондриальных $К^+_{АТФ}$-каналов. Поэтому задачей было оценить комплексный вклад $К^+_{АТФ}$-каналов в регуляцию содержания в организме экспериментальных животных NO и его метаболитов.

Время проведения ИП подобрано таким образом, чтобы последующая ОСМА попадала в отсроченную фазу прекондиционирования, поскольку степень защитного эффекта ИП наиболее выражена при проведении ОСМА через 24 часа после прекондиционирования [3].

Модель ФП с в/ж введением диазоксида была выбрана как одна из наиболее эффективных и воспроизводимых. Однако возможность использования данной модели в эксперименте с определением содержания NO в крови и головном мозге вызвала сомнения. Пункция правого бокового желудочка неизбежно привела бы к формированию перифокальной зоны воспаления и репарации, что могло отразиться на динамике измения содержания NO.

Уровень NO_3^- и NO_2^- измерялся в сыворотке венозной крови через 5, 24 и 72 часа после ОСМА. Содержание свободного NO в головном мозге и комплексов Hb-NO в крови оценивали через 5, 9, 24 и 72 часа после ОСМА. Временные точки подобраны с учетом активности конститутивных и индуцибельной NO-синтаз при развитии ишемического инсульта: 5 и 9 часов охватывают период работы только конститутивных NO-синтаз, а 24-х и 72-часовые точки позволяют оценить активность индуцибельной NO-синтазы [15].

Обсуждение результатов. Использование отдельной серии с введением глибенкламида имело задачу исключить возможность глибенкламида искажать результаты эксперимента, полученные в серии с ИП. Контрольной группе вводили ДМСО, чтобы также исключить и возможность влияния ДМСО на результаты. Введение глибенкламида за 30 минут до ОСМА не привело к значимому изменению размера зоны некроза. Следовательно, в условиях острой ишемии головного мозга блокада как клеточных, так и митохондриальных $К^+_{АТФ}$-каналов не влияет на размер зоны поражения.

Исследование влияния прекондиционирования, проведенного за 24 часа до моделирования инсульта, на размер некроза выявило схожий по величине протекторный эффект ишемического и фармакологического типов прекондиционирования. Предварительное введение глибенкламида нивелировало защитный эффект ИП, что свидетельствует о ключевой роли $К^+_{АТФ}$-каналов в реализации защитных эффектов отсроченной фазы прекондиционирования на головной мозг крыс.

В коре головного мозга наблюдали двукратное снижение уровня свободного NO на всем протяжении периода наблюдения (рис. 3), что отчасти можно связать с гипоперфузией головного мозга. Согласно данным литературы [16] в моделях ОСМА с введением спиновой ловушки в сопоставимых дозировках и с той же длительностью экспозиции наблюдается достоверное повышение регистрируемого ЭПР-сигнала в головном мозге через 15 минут после окклюзии сосуда. Однако этот эффект является обратимым – с течением времени уровень NO постепенно снижается и достигает фоновых значений [17]. Дальнейший рост концентрации NO только за счет работы NO-синтаз в условиях перманентной ишемии не представляется возможным из-за тканевого дефицита кислорода и истощения пула субстратов данного фермента [18].

Продукция NO может регулироваться не только активностью/уровнем экспрессии NO-синтаз, но редокс-статусом гемопротеинов. Такой путь предполагает активацию нитритредуктазной реакции $NO_2^- \rightarrow NO$ с участием гемсодержащих белков (гемоглобина, цитохром с оксидазы, ксантиноксидазы, альдегидоксидазы) в условиях дефицита кислорода [19, 20]. В таком случае при условии повышения восстановительной способности гемсодержащих белков в области ишемической полутени последующая продукция NO может происходить путем активации нитритредуктазных реакций при диффузии NO_2^- из ближайших неишемизированных участков мозга, в которых основной вклад в продукцию NO вносят NO-синтазы.

Еще одним потенциальным механизмом угасания сигнала от комплексов NO со спиновой ловушкой может быть «расход» NO на взаимодействие с активными центрами белков, для которых в условиях гиперпродукции NO возможен переход из растворимого в мембрано-связанное состояние [19]. Такое перераспределение имеет защитную функцию, экранируя ненасыщенные жирные кислоты мембран от свободно-радикальных реакций.

Анализ результатов измерения NO_3^- и NO_2^- (табл. 1), а также комплексов Hb-NO (рис. 1 и 2) в крови крыс

Таблица 1

Динамика изменения концентрации NO_3^- и NO_2^- в сыворотке крови и площадь поражения коры головного мозга у крыс с ишемическим инсультом

		% от фоновой концентрации NO_3^- и NO_2^-			Площадь поражения, %
Время забора крови		5 ч	24 ч	72 ч	
I серия	ОСМА	146 ± 62 ¤	124 ± 56	101 ± 45	12,7 ± 5,9
	Глиб	107 ± 64	69 ± 38 *	62 ± 54	15,1 ± 8,2
II серия	ОСМА	134 ± 58 ¤	109 ± 60	103 ± 42	14,9 ± 7,2
	ИП	110 ± 45	81 ± 24	71 ± 40	9,4 ± 3,7 #
	ИП + Глиб	136 ± 39	73 ± 49 *	81 ± 30	16,8 ± 9,2
III серия	ОСМА	107 ± 26	61 ± 27 ¤	64 ± 13 ¤	13,4 ± 3,4
	Диаз	110 ± 28	63 ± 22	75 ± 22	9,1 ± 4,0 *

Примечание – $p < 0.05$: * – критерий Манна-Уитни, для экспериментальных групп при сравнении с контролем; # – критерий Фишера, ИП vs. ИП+Глиб; ¤ – критерий Вилкоксона, для групп контроля при сравнении с фоновыми значениями.

с ишемическим инсультом выявил общую динамику. В первые 5 часов после ОСМА наблюдали снижение уровня связанного с NO гемоглобина, находящегося в R-конформации, доля которого в норме составляет ~90% от общего количества Hb-NO комплексов. В условиях пониженного содержания кислорода в ткани, а также при действии ряда других регуляторных факторов (2,3-дифосфоглицерат, ацидоз, гиперкапния), часть R-конформеров Hb-NO комплексов может освобождаться от связанного с гемоглобином кислорода и переходить в Т-конформеры, которые значительно слабее удерживают лиганд NO [19]. Это объясняет подобный Т-конформерам подъем концентрации NO_3^- и NO_2^-, образовавшихся в результате окисления NO в данный временной промежуток. Таким образом, комплексы Hb-NO, находящиеся в R-конформации могут одновременно выполнять функции депо и переносчика, а при выполнении R → T перехода в условиях ишемии – донора NO, высвобождение которого может оказывать регуляторное действие. Однако мы не исключаем и возможность повышения концентрации NO_3^- и NO_2^- за счет активной работы эндотелиальной NO-синтазы при повышении перфузионного давления в ишемизированной ткани.

К первым суткам после инсульта наблюдали нормализацию уровня NO_2^- и NO_3^-. Тем временем ситуация с уровнем Hb-NO комплексами кардинально изменилась: лидирующие позиции заняли R-конформеры, а содержание в крови Т-конформеров достигло минимума. Подобный T → R переход можно объяснить как восстановлением накопленных NO_3^- и NO_2^- до NO с последующим формированием Hb-NO комплексов, так и активацией индуцибельной NO-синтазы, в первую очередь в области операционной раны.

Через 72 часа после ОСМА в крови животных наблюдали нормализацию уровня Hb-NO комплексов, очередной R → T переход, а, следовательно, и высвобождение молекул NO. Концентрация NO_3^- и NO_2^- при этом не отличалась от фоновой. Корреляционный анализ выявил обратную зависимость между повышенным уровнем NO_3^- и NO_2^- в сыворотке крови контрольных животных на третьи сутки после инсульта и размером области поражения. Полученный результат косвенно указывает на нейропротекторный эффект умеренной продукции NO в сосудистом русле в период формирования зоны ишемического некроза, что может быть связано с NO-опосредованной вазидилатацией и улучшением коллатеральной гемодинамики в области ишемии [7].

Неожиданным для нас оказалось однонаправленное действие диазоксида и глибенкламида на содержание в крови Hb-NO комплексов через 5 и 9 часов после ОСМА (рис. 1 и 2). Очевидно, что противоположные по действию препараты не могли вызвать подобный эффект за счет изменения проницаемости $K^+_{АТФ}$-каналов. Анализ протоколов исследования выявил лишь одну общую особенность этих групп, которой не было у группы контроля – оба препарата были растворены в ДМСО – неполярном соединении, являющимся эффективным скавенджером ОН-радикалов [21]. Объяснение подъему уровня Hb-NO комплексов кроется в конкуренции между ОН-радикалами и NO за связывание с гемоглобином. Из этого следует, что в условиях пониженной концентрации гидроксил-радикалов в присутствии ДМСО общий уровень Hb-NO комплексов будет выше, чем в контрольной группе.

В группе животных, которым вводили глибенкламид непосредственно перед проведением ОСМА, наблюдали резкое повышение содержания NO в ткани головного мозга на третьи сутки после инсульта (рис. 3). Полученный результат мы связываем с активацией индуцибельной NO-синтазы, уровень которой повышается в ткани в ответ на воспаление. По данным литературы, в клетках микроглии в ответ провоспалительные сигналы увеличивается экспрессия $K^+_{АТФ}$-каналов, а воздействие глибенкламида значительно усиливает степень активации микроглиальных клеток [22], что приводит к повышению продукции цитокинов, NO и АФК [23]. Избыточная продукция АФК на фоне генерации NO индуцибельной NO-синтазой и последующее включение NO в свободно-радикальные реакции являются возможным объяснением снижения уровня NO_3^- и NO_2^- через сутки после инсульта у крыс, которым перед ОСМА вводился глибенкламид (табл. 1). Молекула NO является слабым нитрозилирующим агентом, однако активность NO в значительной степени повышается при образовании более агрессивных соединений, в том числе и с супероксидом [24], а также в реакциях с сульфгидрильными радикалами, генерирующимися при окислении тиолов [25]. Это приведет к тому, что часть молекул NO не будет окисляться до малотоксичных NO_3^- и NO_2^-, но пойдет по пути формирования комплексов со структурными и функциональными компонентами клеток, повреждая их и приводя к гибели клеток в зоне воспаления. В этих же группах мы наблюдали прямую корреляцию между размером зоны некроза и сывороточной концентрацией NO_3^- и NO_2^- через сутки после ОСМА, что также указывает на усиление продукции NO индуцибельной NO-синтазой в результате предполагаемой активации микроглии глибенкламидом.

Активация $K^+_{АТФ}$-каналов диазоксидом за сутки до ОСМА привела к снижению уровня продукции NO в коре головного мозга (рис. 3). Такой эффект можно объяснить гиперполяризацией плазматической мембраны в результате открытия $K^+_{АТФ}$-каналов, что препятствует развитию глутаматной эксайтотоксичности, росту цитоплазматической концентрации ионов Ca^{2+}, а следовательно и синтезу NO de novo кальций-зависимой нейрональной NO-синтазой. Но подобные процессы могут протекать при активации каналов в условиях нарастающей ишемии и в группе контроля, без предварительного введения диазоксида, концентрация которого к моменту ОСМА должна стать предельно малой. Наиболее возможным из предполагаемых механизмов является предшествующее ишемическому повреждению открытие диазоксидом $K^+_{АТФ}$-каналов внутренней мембраны митохондрий, которое приводит к снижению аккумуляции ионов Ca^{2+} митохондриями [5] и препятствует деполяризации внутренней мембраны в период тяжелой ишемии [26]. Последующее усиление интенсивности окислительного фосфорилирования может замедлять образование NO нитритредуктазными системами дыхательной цепи митохондрий. Кроме того, предотвращение кальциевой перегрузки снижает активность митохондриальной изоформы нейрональной NO-синтазы, которая является Ca^{2+}-зависимым ферментом [27].

Итак, мы выяснили, что $K^+_{АТФ}$-каналы занимают одну из ключевых позиций в развитии защитных эффектов прекондиционирования на головной мозг крыс с ишемическим инсультом. Причем система $K^+_{АТФ}$-каналов внутренней мембраны митохондрий выполняет роль регулятора ферментативного пути образования NO клетками головного мозга в условиях энергетического дефицита, что может быть связано с основной функцией этих каналов – регуляцией ионного состава матрикса митохондрий, интенсивности клеточного дыхания и продукции АТФ. Помимо участия в процессах прекондиционирования, $K^+_{АТФ}$-каналы, по-видимому, занимают особое место в регуляции интенсивности процессов микроглиального воспаления в ишемизированной ткани. Полученные данные также свидетельствуют и о важной роли нитритредуктазных взаимодействий метаболитов NO с гемсодержащими белками в регуляции содержания NO в кровеносном русле.

Дальнейшего изучения требуют механизмы сохранения мембранного потенциала, эффективности утилизации субстратов, а также влияния NO на клеточное дыхание в прекондиционированных митохондриях в период наступления острой ишемии. Исследование свойств комплексов NO с гемсодержащими белками крови может быть востребовано в поиске способов улучшения коллатеральной гемодинамики у больных с ишемическим инсультом.

Литература

1. *Шмонин А.А., Байса А.Е., Мельникова Е.В. и соавт.* Защитные эффекты раннего ишемического прекондиционирования при фокальной ишемии мозга у крыс: роль коллатерального кровообращения // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2011. – Т. 97, № 2. – С. 203–213.

2. *Маслов Л.Н., Халиулин И.Г., Подоксенов Ю.К.* Нейропротекторный и кардиопротекторный эффекты гипотермического прекондиционирования // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2012. – № 1. – С. 67–72.

3. *Самойленкова Н.С., Гаврилова С.А., Кошелев В.Б.* Нейропротекторный и ангиопротекторный эффекты ишемического/гипоксического прекондиционирования мозга // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2008. – Т. 1, № 25. – С. 82–92.

4. *Ding Z.M., Wu B., Zhang W.Q. et al.* Neuroprotective effects of ischemic preconditioning and postconditioning on global brain ischemia in rats through the same effect on inhibition of apoptosis // Int. J. Mol. Sci. – 2012. – Vol. 13, № 5. – P. 6089–6101.

5. *Murata M., Akao M., O'Rourke B. et al.* Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca^{2+} overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection // Circ. Res. – 2001. – Vol. 89, № 10. – P. 891–898.

6. *Миронова Г.Д., Качаева Е.В., Крылова И.Б. и соавт.* Митохондриальный АТФ-зависимый калиевый канал. Роль канала в защите сердца от ишемии // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2007. – № 2. – С. 44–49.

7. *Jung K.H., Chu K., Ko S.Y. et al.* Early intravenous infusion of sodium nitrite protects brain against in vivo ischemia-reperfusion injury // Stroke. – 2006. – Vol. 37, № 11. – P. 2744–2750.

8. *Brown G.C., Cooper C.E.* Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase // FEBS Lett. – 1994. – Vol. 356, № 2–3. – P. 295–298.

9. *Sasaki N., Sato T., Ohler A. et al.* Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide // Circulation. – 2000. – Vol. 101, № 4. – P. 439–445.

10. *Mikoyan V.D., Kubrina L.N., Serezhenkov V.A. et al.* Complexes of Fe^{2+} with diethyldithiocarbamate or N-methyl-D-glucamine dithiocarbamate as traps of nitric oxide in animal tissues // Biochim. Biophys. Acta. – 1997. – Vol. 1336. – P. 225–234.

11. *Gainutdinov Kh.L., Gavrilova S.A., Iyudin V.S. et al.* EPR study of the intensity of the nitric oxide production in rat brain after ischemic stroke // Appl. Magn. Reson. – 2011. – Vol. 40, № 3. – P. 267–278.

12. *Liu D., Lu C., Wan R. et al.* Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels protects neurons against ischemia-induced death by a mechanism involving suppression of Bax translocation and cytochrome c release // J. Cereb. Blood Flow. Metab. – 2002. – Vol. 22, № 4. – P. 431–443.

13. *Marshall J.M., Thomas T., Turner L.* A link between adenosine, ATP-sensitive K^+ channels, potassium and muscle vasodilatation in the rat in systemic hypoxia // J. Physiol. – 1993. – Vol. 472. – P. 1–9.

14. *Shimizu K., Lacza Z., Rajapakse N. et al.* MitoK(ATP) opener, diazoxide, reduces neuronal damage after middle cerebral artery occlusion in the rat // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2002. – Vol. 283, № 3 – P. H1005–H1011.

15. *Kitamura Y., Matsuoka Y., Nomura Y. et al.* Induction of inducible nitric oxide synthase and heme oxygenase-1 in rat glial cells // Life Sci. – 1998. – Vol. 62, № 17–18. – P. 1717–1721.

16. *Chen S.H., Fung P.C., Cheung R.T.* Neuropeptide Y-Y1 receptor modulates nitric oxide level during stroke in the rat // Free Radic. Biol. Med. – 2002. – Vol. 32, № 8. – P. 776–784.

17. *Yuan Z., Liu W., Liu B. et al.* Normobaric hyperoxia delays and attenuates early nitric oxide production in focal cerebral ischemic rats // Brain Res. – 2010. – Vol. 1352. – P. 248–254.

18. *Morikawa E., Huang Z., Moskowitz M.A.* L-arginine decreases infarct size caused by middle cerebral arterial occlusion in SHR // Am. J. Physiol. – 1992. – Vol. 263, № 5. – P. 1632–1635.

19. *Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е. и соавт.* Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. – М.: Наука, 1997. – 156 с.

20. *Li H., Cui H., Kundu T.K. et al.* Nitric oxide production from nitrite occurs primarily in tissues not in the blood: critical role of xanthine oxidase and aldehyde oxidase // J. Biol. Chem. – 2008. – Vol. 283, № 26. – P. 17855–17863.

21. *Panganamala R.V., Sharma H.M., Heikkila R.E.* Role of hydroxyl radical scavengers, dimethyl sulfoxide, alcohols, and methional in the inhibition of prostaglandin synthesis // Prostaglandins. – 1976. – Vol. 11, № 4. – P. 599–607.

22. *Ortega F.J., Gimeno-Bayon J., Espinosa-Parrilla J.F. et al.* ATP-dependent potassium channel blockade strengthens microglial neuroprotection after hypoxia-ischemia in rats // Exp Neurol. – 2012. – Vol. 235, № 1. – P. 282–296.

23. *Wang T., Qin L., Liu B. et al.* Role of reactive oxygen species in LPS-induced production of prostaglandin E2 in microglia // J. Neurochem. – 2004. – Vol. 88, № 4. – P. 939–947.

24. *Espey M.G., Thomas D.D., Miranda K.M. et al.* Focusing of nitric oxide mediated nitrosation and oxidative nitrosylation as a consequence of reaction with superoxide // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – Vol. 99, № 17. – P. 11127–11132.

25. *Shen B., English A.M.* Mass spectrometric analysis of nitroxyl-mediated protein modification: comparison of products formed with free and protein-based cysteines // Biochemistry. – 2005. – Vol. 44, № 42. – P. 14030–14044.

26. *Kim M.Y., Kim M.J., Yoon I.S. et al.* Diazoxide acts more as a PKC-epsilon activator, and indirectly activates the mitochondrial K(ATP) channel conferring cardioprotection against hypoxic injury // Br. J. Pharmacol. – 2006. – Vol. 149, № 8. – P. 1059–1070.

27. *Dedkova E.N., Blatter L.A.* Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase // J. Physiol. – 2009. – Vol. 587. – P. 851–872.

ФЕНОМЕНЫ ПРЕ- И ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ: ОТ СТАРОГО ПРИНЦИПА К НОВОЙ СТРАТЕГИИ ТЕРАПИИ

С.Г. Журавский[1, 2], М.М. Галагудза[1, 2], М.С. Просвирина[1], Иванов С.А.[2]

[1] Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия
[2] Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

Журавский Сергей Григорьевич – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории слуха и речи НИЦ СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова; ведущий научный сотрудник НИЛ нанотехнологий Института экспериментальной медицины ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» Минздрава России; *Галагудза Михаил Михайлович* – доктор медицинских наук, руководитель Института экспериментальной медицины ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, профессор кафедры патофизиологии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова; *Просвирнина Мария Сергеевна* – лаборант Лаборатории биофизики кровообращения Института сердечно-сосудистых заболеваний СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова; *Иванов Сергей Александрович* – аспирант лаборатории слуха и речи НИЦ СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, младший научный сотрудник вивария Института экспериментальной медицины ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» Минздрава России.

Контактная информация: СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова ул. Льва Толстого 6/8, Санкт-Петербург, Россия, 197022. Тел: (812) 234-05-76. E-mail: s.jour@mail.ru (Журавский Сергей Григорьевич).

Резюме.

Феномены пре- и посткондиционирования стали целенаправленно изучаться с конца 80-х годов ушедшего столетия сначала в кардиологии, а затем и в других областях экспериментальной медицины. В то же время, их защитные свойства были известны в сложившихся культурных и социальных стереотипах человека, а также интуитивно использовались среди методов лечения бытовой и эмпирической медицины. Как физиологические явления пре- и посткондиционирование неспецифичны и встречаются в различных областях современной медицины, а также естествознания.

Феномены пре- и посткондиционирования являются одними из принципов естественного течения ряда заболеваний, в частности, при коморбизме, а также ставших традиционными методов лечения. С учетом понимания их протективных преимуществ уже сегодня может быть пересмотрена и дополнена стратегия профилактики и терапии ведущих хронических прогрессирующих заболеваний человека.

Ключевые слова: прекондиционирование, посткондиционирование, адаптация, компенсация, параальтеративная защита, тканевая терапия.

PRE- AND POSTCONDITIONING PHENOMENA: FROM OLD PRINCIPLE TO A NEW THERAPEUTIC STRATEGY

S.G. Zhuravsky[1, 2], M.M. Galagudza[1, 2], M.S. Prosvirina[1], Ivanov S.A.[2]

[1] Saint-Petersburg Pavlov State Medical University, Saint-Petersburg, Russia
[2] Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: s.jour@mail.ru (Sergey G. Zhuravsky – DM, Advanced Research Scientist, Scientific Research Laboratory of Nanotechnologies, Institute of Experimental Medicine).

Abstract.

The systematic investigation of the phenomena of pre- and postconditioning was started in the end of 80ies first in the experimental cardiology, rapidly spreading to the other fields of medicine. It is known, however, that the protective properties of pre- and postconditioning have been identified in the cultural and social activities of the man. In addition, the protective potential of pre- and postconditioning has been intuitively used for the treatment in the everyday and empiric medicine. As physiological entities, pre- and postconditioning are quite non-specific and could be found in different areas of current medicine and natural science.

The phenomena of pre- and postconditioning represent one of the principles of the natural course of the disease, including that in co-morbidities and traditional treatment approaches. While keeping in mind the protective advantages of pre- and postconditioning, we can re-evaluate and upgrade both current preventive strategies and treatment options in the most common human chronic disease.

Key words: preconditioning, postconditioning, adaptation, compensation, para-alterative protection, tissue therapy.

Статья поступила в редакцию 01.09.2012, принята к печати 10.09.2012.

Нине Максимовне Суковатовой –
доценту кафедры факультетской терапии –
нашему учителю посвящаем с искренней благодарностью

…То, что не убивает нас, делает нас сильнее…
Фридрих Ницше
«Сумерки идолов,
или как философствуют молотом»
(гл. “Изречение и стрелы”), 1888

Введение

Прекондиционирование (ПреК) — неспецифический биологический феномен индуцированного повышения способности ткани (органа, организма) переносить тяжелое повреждение после предварительного воздействия стрессового стимула меньшей интенсивности. Современная история изучения ПреК началась после того, как в 1986 году на модели кратковременной коронарной окклюзии было отмечено немедленное развитие толерантности сердца к последующей более продолжительной ишемии [1]. Поскольку первоначально выявленным индуктором ПреК явилась кратковременная ишемия, этот феномен в литературе стали называть «ишемическим ПреК» [2]. Со временем изучение вопроса привело к расширению представлений о явлении за счет выделения раннего и позднего (отсроченного) ПреК [3], а также описания близкого феномена посткондиционирования (ПостК) [4]. Последним стали называть состояние повышения устойчивости миокарда к реперфузионному повреждению после создания в раннем реперфузионном периоде нескольких коротких ишемических эпизодов [5]. Общим у этих феноменов является достижение цито- и органопротективного состояния, различным – период развития состояния резистентности.

Последние два десятилетия активно изучаются механизмы ПреК и ПостК, причем с каждым годом этих сведений становится все больше [4, 6]. Механизмы описанных явлений представлены сложнейшим комплексом изменений внутриклеточного молекулярного гомеостаза (фосфорилирование различных семейств киназ, модуляция трансмембранных ионных токов и др.), придающим клеткам толерантность к повреждению. Для раннего ПреК и ПостК эти изменения характеризуются понятием «фенотипической пластичности» [7] – способностью под действием стрессового раздражителя организовывать ряд «аварийных» (срочных) перестроек: посттрансляционную модификацию белков, их фосфорилирование и пр. [8]. Напротив, для позднего ПреК характерны более глубокие изменения, а именно, экспрессия специфичных стресс-протекторных белков *de novo* [3], что является механизмом долговременной защиты, затрагивающим адаптационные возможности отдельных органов и всего организма [8].

Традиционная классификация экспериментальных вариантов ПреК и ПостК строится с учетом периода создания защитного состояния относительно момента повреждения и природы индуктора (табл. 1).

Основной вывод, который можно сделать, анализируя существующую литературу, касающуюся ПреК и ПостК, – неспецифичность условий их возникновения. Эти феномены отмечены в экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo*, на различных биологических объектах: рыбах, крысах, кроликах, свиньях, собаках и на человеке. Более того, по-видимому, они являются универсальными для всех живых организмов, когда речь идет о защитно-приспособительных реакциях, к примеру: у одноклеточных организмов — микробов (приобретение устойчивости к антибактериальным препаратам при нерациональном применении антибиотиков в дозах ниже бактерицидных) или у растений (в частности, состояние выработки «биогенных стимуляторов» [9, 10]). В эксперименте ПреК воспроизводится на моделях повреждения различных органов: сердца [11], головного мозга [12], печени [13], тонкой кишки [14], улитки внутреннего уха [15]. Защитный эффект ПостК продемонстрирован на сердце [16] и головном мозге [17].

В зависимости от природы индуктора и функционального состояния защищаемого органа, прекондиционирующий стимул может иметь характер адекватного или неадекватного раздражителя. Так, к примеру, для сердца в роли адекватного раздражителя выступает

Таблица 1

Классификация типов пре- и посткондиционирования (по сводным данным [2, 7])

	Прекондиционирование	**Посткондиционирование**
1. По периоду создания защитного эффекта	1.1. Раннее; 1.2. Позднее.	1.1. Раннее; 1.2. Позднее (показано на мозге).
2. По природе индуктора	2.1. Ишемическое; 2.2. Метаболическое (гипергликемия при сахарном диабете, гипер- и гипотиреоз); 2.3.Фармакологическое; 2.4.Физическое (ультразвук).	2.1. Ишемическое; 2.2. Фармакологическое.

повышение нагрузки на левый желудочек при его высокочастотной электростимуляции [18], а в роли неадекватного – ишемия или факторы физического ПреК [6]. Аналогичным образом, для головного мозга адекватным стимулом может считаться привычная интенсивная умственная работа [19], а неадекватным – ишемия, гипоксия и фармакологические агенты [20]. Для спирального органа внутреннего уха качеством первого обладает звук (шум) субтравматической интенсивности и короткой экспозиции [21], а второго – ототоксические препараты в малых дозах [22–24] и ишемия в вертебро-базилярном бассейне [25].

Таким образом, неспецифичность, распространенность и физиологическая значимость феноменов ПреК и ПостК ставят их на один уровень с такими общебиологическими процессами, как клеточная гибель, регенерация, дифференцировка, адаптация и компенсация.

При широком рассмотрении ПреК его сущность представляется частью общебиологического процесса саногенеза цитопротективной направленности, регулируемого индивидуальными этно- и/или видоспецифичными генетически детерминированными возможностями организма. Ключевые характеристики ПреК и ПостК представлены в табл. 2.

Характерные особенности ПреК и ПостК ярче выглядят при их сравнении не только между собой, но и с другими близкими защитными феноменами: адаптацией и компенсацией. Подобная теоретическая задача до настоящего времени не была разработана. Анализ ярких бесспорных примеров ПреК, ПостК, адаптации и компенсации позволил нам выделить ряд дифференциальных критериев, характеризующих каждый из них. При этом предлагается объединить все эти явления в группу «неспецифических защитных феноменов», обозначив ПреК и ПостК корневым понятием «параальтернативной защиты» (рис. 1). Под последним мы подразумеваем группу из известных в физиологии эволюционно-сформированных феноменов, реализующих свое защитное действие в непосредственной связи и временной близости с основным повреждающим воздействием. В ряде случаев отличия между ними не вызывают сомнений. Однако значительные сложности для обсуждения представляет дифференцирование состояния ПреК и адаптации (табл. 3).

С общебиологических позиций эти механизмы являются составляющими единой системы неспецифической защиты живых систем и могут вовлекаться организмом для реализации, а также преемственно сменять друг

Таблица 2

Принципы реализации феноменов прекондиционирования и посткондиционирования

– индуктор по своей природе должен являться повреждающим фактором, но действовать с меньшей интенсивностью, то есть субпороговой в отношении экспозиции и концентрации (не вызывающей гибель клетки или органа); – индуктор прекондиционирования неспецифичен по природе (в отличие от адаптации); – у прекондиционирующего стимула должна быть общая, т. е. конкурентная, с повреждающим фактором мишень воздействия (внутриклеточная, клеточная, органная); – приводят к цитопротективному эффекту, представляющему многоплановые изменения внутриклеточного молекулярного гомеостаза, выполняющие общеадаптационную функцию; – ограничены рамками онтогенетических и индивидуальных генетически-детерминированных функциональных возможностей.

Таблица 3

Дифференциально-диагностические критерии группы адаптивных феноменов

Критерии отличия	ПреК	Адаптация	ПостК	Компенсация
Фоновое состояние организма	Стабильное течение патологии (преимущественно) или норма	Норма (преимущественно) или условия функциональной нагрузки в рамках физиологических девиаций	Патология	Патология
Период осуществления	До повреждения или наступления дестабилизации	До возникновения повреждения	После повреждения	После повреждения
Характер индуктора	Неспецифический	Специфический	Неспецифический	Специфический
Природа механизмов развития	Негенетические (раннее ПреК); генетические (позднее ПреК)	Генетические	Негенетические	Генетические и негенетические (рефлекторные)
Повреждающее действие индуктора	Обязательно (сублетальное)	Отсутствует	Отсутствует	Обязательно
Длительность защитного эффекта	Короткая (до десятков минут для раннего ПреК); 24–72 часа (для позднего ПреК)	Длительная: недели, месяцы	Не уточнено	Длительная: недели, месяцы, годы
Морфологи-ческий субстрат на клеточно-тканевом уровне	Отсутствует	Гиперплазия внутриклеточных органелл, увеличение клеточности, ангиогенез	Отсутствует	Гиперплазия ткани, гипертрофия органа
Классические клинико-эксперименталь-ные примеры	Ишемическое ПреК [1]; тканевая терапия [9]; интервальная гипоксическая тренировка [26]	Общий адаптационный синдром [27]; закаливание [28]; неспецифически повышенная сопротивляемость, вызванная фитоадаптогенами [29]; гипертрофия левого желудочка при артериальной гипертензии, аортальном стенозе [30]	Ишемическое ПостК [5]; гипербарическая оксигенация [31] и гипотермия после инсульта [32]	Компенсаторная гипертрофия одного из парных органов в условиях удаления или частичной резекции другого (почка, доля печени, легкого) [33]; гипертрофия сохранившегося миокарда левого желудочка после инфаркта миокарда [34]; увеличение частоты дыхания при хронической обструктивной болезни легких

друга в зависимости от условий. Предполагаемая взаимосвязь неспецифических защитных феноменов и последовательность их активизации относительно момента действия повреждающего стимула представлена на рис. 2.

Последующая часть обзора будет посвящена анализу феноменов ПреК и ПостК не только как механизмов предотвращения ишемического и реперфузионного повреждения определенных органов, но и как универсальных принципов защиты, действующих в живой природе.

Несмотря на то, что обсуждаемые феномены стали целенаправленно изучаться только с конца 80-х годов ушедшего столетия, вся повседневная жизнь человека, а также сложившиеся культурные и социальные стереотипы, бытовая и эмпирическая медицина насыщены примерами естественной реализации на практике принципов ПреК и ПостК.

Принципы ПреК и ПостК в культурной и социо-профессиональной реализации

Биологический механизм защиты, лежащий в основе экспериментального феномена ПреК, имеет свою параллель и в философской мысли. Известный афоризм Ф. Ницше, предложенный в эпиграфе, и созвучные ему: «лишь поражения раздвигают наши границы», идея библейского достижения истины через страдания и лишения дают все основания полагать, что принцип предвоздействия реализуется в психологии воспитания и роста личности.

Закономерность ПостК была интуитивно воспринята писательской мыслью. Поэт Н.А. Некрасов следующим образом обратил внимание на годами сформированный психофизический стереотип существования человека в окружающей среде. В стихотворном цикле «О погоде» («До сумерек», 1865 г.) автор обращается к пожилому типографскому рассыльному Минаю: «Да пора бы тебе на покой. / То-то нет! говорили мне многие, / Даже доктор (в тридцатом году / Я носил к нему «Курс Патологии»): / «Жить тебе, пока ты на ходу!» / И ведь точно: сильней нездоровится, / Коли в праздник ходьба остановится: / Ноет спинушка, жилы ведет! / Я хожу уж полвека без малого, / Человека такого усталого / Не держи – пусть идет!». Н.С. Лесков также подметил и показал в рассказе «Однодум» (1889 г.) это человеческое свойство: мать главного героя, лишенная возможности заниматься привычным для своей жизни занятием, умирает, когда ей «нечего было делать на земле после того, как она не могла на ней продавать пироги».

ПреК является одним из принципов социальной деятельности человека: организация учебы, творческой деятельности, переход от любительского к профессиональному уровню, организация большого бизнеса вслед за малым и пр. Начало рабочей недели после выходных и праздников большинство предпочитает проводить в щадящем (прекондиционирующем) режиме, воспринимая этот момент как слишком трудный, при этом более интенсивная работа откладывается на последующие дни. Эмоциональное ощущение музыки значительно сильнее при построении музыкальной фразы в форме крещендо. Точно также и речь в монологе (если это не сигнал о

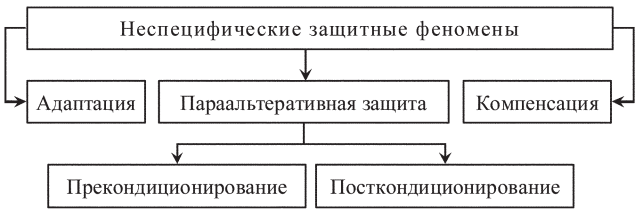


Рис. 1. Место пре- и постондиционирования в ряду защитных феноменов.

тревоге) или вокальные упражнения у профессионалов голоса («методика Емельянова») традиционно строятся в варианте нарастания интенсивности звучания голоса.

ПреК и ПостК как интуитивно реализуемые защитные принципы

Примерами практик, интуитивно базирующихся на принципе ПреК, являются известные методические подходы, развивающие физиологические функции. Всем привычные целенаправленные физические разминки здорового человека, как перед обычной тренировкой, так и перед выступлением для достижения спортивного результата можно рассматривать как пример ПреК.

Древняя монастырская традиция вкушения икры и рыбы на Лазареву субботу и Вербное воскресение, являясь послаблением в жестких требованиях к трапезе за неделю до окончания Великого поста, одновременно оказывается и удивительно физиологически целесообразной с точки зрения «диетического» ПреК перед разговением, подготавливая активность желудочно-кишечного тракта к кардинальному изменению характера пищи после Пасхи.

По аналогии с понятием «народная медицина» можно говорить и о «народных» способах ПреК – тренировках в отношении сложных жизненных ситуаций, к примеру, давний обычай закаливания на холоде в деревнях Русского Севера. («В палящий мороз малютки бегают босиком по снегу, единственно в одной рубашке с голой грудью...», «…взрослые беззаботно стоят несколько ча-

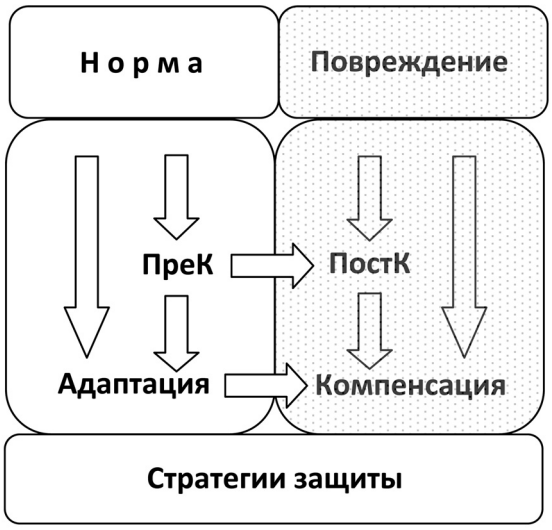


Рис. 2. Упрощенная схема последовательности вовлечения защитных феноменов в зависимости от состояния биологической системы (клетки, органа, ткани).

сов на улице в трескучие морозы, еще и со спеленатыми младенцами, в одном легоньком кафтане…, без шапок… и башмаках на босу ногу…» (цит. по Ефименко П.С., 2009). Несомненно несет духовно-мистический смысл, и при этом не без физического (телесного) приложения фольклорный обычай у восточных славян крещенского купания в прорубях-иорданях, выполняющего своего рода прекондиционирующее значение, вернее всего, в отношении периода зимне-весенних простудных заболеваний (Ср. у Н.С. Лескова в хронике «Соборяне»: «Госпожа Плодомасова вчера по водоосвящении прямо во всем, что на ней было, окунулась в прорубь. Удивился! Спросил, — всегда ли это бывает? Говорят: всегда, и это у нее называется «мовничать». Экой закал предивный!» – Собр. соч.: В 11 т. М., 1957. Т. 4. С. 54).

Такой же прекондиционирующий смысл несет принцип постепенности и возрастания объемов при введении прикорма в пищевой рацион младенцев, преследующий цель не допустить развития пищевой идиосинкразии, аллергических реакций, желудочных и кишечных диспепсий.

Принцип ПреК лежит в основе традиционного способа профилактики солнечных ожогов кожи фотосенсибилизирующими экспозициями. Малые по времени и дозам инсоляция или искусственное ультрафиолетовое облучение применяются перед последующим более интенсивным загоранием.

Философский смысл ПреК несут собой идея вакцинации, методика получения биоматериала для живых аттенуированных профилактических вакцин, поддержание естественного противотуберкулезного иммунитета.

ПреК и ПостК как физиологические принципы защиты

Широко известный в биологии феномен гормезиса, проявляющийся, в частности, снижением заболеваемости раком при хроническом воздействии малых доз облучения (от 1 до 0,5 Гр), сегодня рассматривается как эквивалент ПреК [35].

Неоднократно замечено, что для периода пренатального развития повышенная активность ряда гелиогеографических факторов, в частности, солнечная активность, определяет повышенную устойчивость организма и его гомеостатических систем к действию экстремальных условий среды в течение всей последующей жизни [36].

В качестве примера ПостК как саногенетического процесса можно рассматривать естественный отказ от пищи заболевшего животного и человека при инфекционных и воспалительных заболеваниях. Отмечено, что отсутствие питания, являясь гибельным состоянием для живых систем, в ситуации дозированного голодания приводит к заметному снижению активности бактериального воспаления, вызванного, например, пневмококком и золотистым стафилококком [37]. Возникающее в условиях пищевой депривации резкое снижение концентрации в плазме крови основных энергетических субстратов приводит к полной блокаде клеточной миграции из кровеносного русла, элиминации из очага воспаления эозинофилов, тучных и плазматических клеток, медиаторов и продуктов воспаления, неспецифически расходующихся для трофики макроорганизма [38, 39].

Феномен ПреК у растений

Удивительно идентичны царству животных неспецифические защитные феномены в физиологии растений. Растениям свойственны холодовое и тепловое закаливание (эквивалент адаптации), предобработка (эквивалент ПреК), компенсаторные явления. Так, прекондиционирующим эффектом может являться воздействие холода в зимний период, дающее толчок к фазе прорастания у ряда семян и к вегетации у луковичных растений. Традиционный для наших квартир кактус «декабрист» (*Zygocactus truncatus*) начинает закладывать бутоны после смены температурного режима с тепла на холод, что имеет место в зимний период.

Индукторами ПреК у растений могут выступать кратковременное воздействие температурного фактора повреждающей интенсивности [40], создание условий водной депривации – подсушивание при прорастании семян, определяющее развитие засухоустойчивости [41], световая депривация [42], а так же все тот же классический «ишемический» стимул (см. далее о механизме «тканевой терапии»).

Так же как и у животных, механизм раннего ПреК у растений связывают не с синтезом белков *de novo*, а с регуляцией уровня активности ферментов за счет конформационных перестроек, изменением внутриклеточной концентрации ионов кальция и калия, а также стресспротекторным эффектом органических соединений (пролин, полиамины, олигосахариды), растительных фитогормонов и цитокинов [40].

Феномен ПостК в бытовой медицине

Ранее методы лечения, интуитивно строящиеся на основе принципов ПреК и ПостК, были достаточно широко распространены в медицине. Господствовавшая в начале и первой половине прошлого века идеология терапии, согласно которой лечит не наше вмешательство само по себе, а то, что после него происходит в организме, является тому подтверждением. В дальнейшем в нашем обзоре мы намеренно будем использовать для иллюстрации примеры из работ, являющихся медицинской классикой.

Идея ПостК широко представлена среди лечебных подходов и методов бытовой медицины. Классическими примерами эффекта ПостК в домашней практике являются лечебные эффекты теплоты и холода, воздействующих в меньших интенсивностях, чем предшествующее повреждение крайними температурами. Так, в бытовой медицине существуют рекомендации при отморожении «не согревать сразу», «не входить в тепло и оттирать пострадавшие от мороза члены снегом…, …обмывать холодной водой…, оттирать холодным сукном или рукавицами, принесенными с холода, …не дотрагиваться до обмороженного здоровыми руками, чтоб не вспузырилось» [43], прикладывать мерзлую кислую капусту [44]. В известном руководстве Л. Блау конца XIX века находим аналогичную рекомендацию при общих отморожениях и озноблениях: «… содержат в неотопленной комнате, оттирают холодным мокрым полотенцем, льдом или снегом, … вначале помещают в холодную ванну, затем в прохладную…», при местных: «… медленное и посте-

пенное согревание. Закутывают в полотенце, смоченное вначале холодной, а затем тепловатою водою» [45]. У европейского классика дерматологии Ф. Гебры читаем: «… пораженный член кладут в холодную колодезную воду, куда понемногу добавляют теплую, кладут компресс, намоченный холодною водою и отмороженная часть тела под ним уже сама собою нагревается» [46].

Обоснованность рекомендации в качестве первой помощи при ожоге кожи использовать не холодную воду, а теплую становится сегодня понятной именно с позиций механизма ПостК. Опытный повар приближает обожженную руку к огню или выдерживает некоторое время в горячей воде, чем достигается значительное облегчение боли и прогноз быстрого выздоровления [47].

Баня, теплые общие ванны, стимулируя потоотделение, способствуют прохождению естественного кризиса, для чего и рекомендуются у длительно лихорадящих больных при простудных заболеваниях [43, 48].

Феномены ПреК и ПостК и теория «биогенных стимуляторов» В.П. Филатова

Удивительно укладывается в современные представления о ПреК и ПостК концепция «тканевой терапии» академика В.П. Филатова, широко обсуждавшаяся в 30–50-х годах XX столетия.

«Тканевая терапия» — передовая для своего времени концепция неспецифического лечения, разработанная на почве решения офтальмологической проблемы улучшения результатов пересадки роговицы. Основное положение теории в следующем: «всякая живая ткань (животного или растительного происхождения), сохраняемая в условиях, *затрудняющих ее существование* (курсив авт.), подвергается биохимической перестройке с образованием стимуляторов, повышающих обмен веществ в ней. Будучи введены в какой-либо организм, эти стимуляторы повышают обмен веществ его тканей, что способствует усилению его физиологических функций и выздоровлению» [10]. В.П. Филатов называет эти вещества по-разному: «тканевые стимуляторы», «биогенные стимуляторы», «продукты консервации», «вещества сопротивления», «продукты переживания», «физиологические медикаменты» [9].

Условия, способствующие выработке подобных субстанций, и это необходимо подчеркнуть, в экспериментах В. П. Филатова были неспецифичны и включали низкую температуру, темноту, облучение рентгеновскими или гамма-лучами, интенсивную работу мышц и даже такой курьезный фактор, как пребывание в накуренном помещении.

Поскольку состояние «переживания» отделенных тканей (листьев растений) по сути аналогично ишемическому состоянию животных организмов, выработка и накопление таких стимулирующих веществ в срезанных растениях (листьях алоэ), рассматриваясь с позиций теории ПреК, является проявлением краткосрочных перестроек, обеспечивающих поддержание жизнеобеспечения в экстремальных ситуациях (темновой стресс на холоде). При этом эффект подобных субстанций при введении в организм больного будет развиваться по механизму ПостК.

Современным отражением идеи В.П. Филатова в исследованиях, посвященных ПреК, являются эксперименты, выполненные E.W. Dickson с соавт. в 1999–2000 гг. На модели изолированного сердца кролика эти авторы наблюдали следующий эффект: перфузат, оттекающий от сердца-донора, подвергнутого ПреК, при доставке к сердцу-акцептору, придавал последнему дополнительную резистентность к ишемии, сопоставимую по величине с эффектом классического ишемического ПреК [49].

Таким образом, «тканевая терапия» может считаться эмпирически разработанной предтечей фармакологического способа ПостК, при котором состояние активизации защитных механизмов в патологических условиях достигается введением «биогенных стимуляторов» (надо понимать – миметиков ПостК). Концепцией В.П. Филатова о «тканевой терапии» уже в середине XX в. были определены основные принципы реализации ПреК и ПостК и их общебиологическое значение (табл. 2): защитный эффект, неспецифичность индуктора, неспецифичность феномена в тканевом и в видовом отношении (тканевые стимуляторы растительного происхождения влияют как на животные, так и на растительные организмы). В рамках это новаторской и, к сожалению, забытой в последнее время теории еще 60 лет назад были впервые научно разработаны общефизиологические механизмы, концепция терапевтического применения, а также предложены направления дальнейшего изучения феноменов, которые сегодня терминологически обозначены как ПреК и ПостК.

Проявления феноменов ПреК и ПостК при естественном течении заболеваний и сочетанной патологии

Принцип ПреК в ряде случаев является основой построения защитных реакций не только при физиологическом состоянии организма, но и в патологических условиях. Прием алкогольных напитков в существенной дозе «новичку» не обойдется без жестоких симптомов отравления в сравнении с человеком, страдающим бытовым пьянством. Причиной выраженной интоксикации можно считать отсутствие «прекондиционирующего» анамнеза привычного приема малых доз алкоголя, интенсифицирующих естественные механизмы дезинтоксикации. Аналогичным образом «воспитываются» защитные глоточный, кашлевой рефлекс при раздражении слизистой верхних дыхательных путей на этапе привыкания к табакокурению.

Известные в клинике острые инфекции с гиперэргическим характером воспаления (крупозная пневмония, туберкулезный плеврит, ангина) развиваются при условии исключительного фонового здоровья субъектов, при сохранном (не депрессированном) иммунном ответе. Иными словами, при отсутствии «сенсибилизирующего», надо полагать, прекондиционирующего эффекта недавно перенесенных простудных состояний, вызванных менее вирулентной инфекцией.

Своеобразным вариантом ПреК можно рассматривать эффект некоторых наследственных заболеваний, сопровождающихся нарушениями обмена, например,

гиперурикемию, синдром Марфана, синдром Морриса. Накопление определенных метаболитов в этих случаях способно оказывать стимулирующее влияние на нейрональную активность, что проявляется повышенной интеллектуальной активностью [50].

Принцип ПостК лежит в основе установления баланса между обострениями (частота и выраженность) и ремиссиями при течении хронических рецидивирующих патологических процессов. Старые дерматологи интуитивно видели неоднозначные взаимоотношения между патологическим субстратом хронической патологии и характером ее течения. Существует каноническое, подтвержденное многолетней клинической практикой и передаваемое изустно мнение, что далеко не все случаи псориаза и хронической экземы нуждаются в интенсивной терапии [51]. Так, в условиях малоагрессивного течения для поддержания ремиссии эмпирически считается нецелесообразным полное устранение так называемых «дежурных» высыпных элементов на коже. Замечено, что при наличии предшествующей стенокардии значительно реже развиваются такие осложнения инфаркта миокарда, как нарушения ритма, кардиогенный шок и сердечная недостаточность [52].

С точки зрения обсуждаемого вопроса, любопытен анализ характера естественного течения коморбидной патологии (по аналогии с известными вариантами взаимодействия фармакологических препаратов – суммацией, потенцированием, антагонизмом). Так, в одном организме два патологических процесса могут протекать независимо друг от друга (ишемическая болезнь сердца (ИБС) и хронический холецистопанкреатит, мочекислый диатез, атеросклероз мозговых сосудов и сенсоневральная тугоухость, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) и деформирующий остеоартроз и пр.) или оказывать взаимное влияние. Возможно усугубление течения одной из патологий, отмечавшееся еще Гиппократом: «у одержимого чахоткой наступающий понос – смертельный признак» [53] или «если больного водянкой захватит кашель, он – безнадежен» [54]. Тот же результат в коморбизме имеет течение ИБС при ХОБЛ [55–58], дизентерии при хроническом алкоголизме [59], сердечно-сосудистой патологии при диабетической нефропатии у пациентов, находящихся на перитонеальном диализе [60], вирусного гепатита при алкогольном гепатозе [61], пневмонии при сахарном диабете, мононуклеоза при обострении хронической инфекции вируса простого герпеса 1 типа, цитомегаловируса, псевдотуберкулеза и токсоплазмоза [62], БА при язвенной болезни [63], атопической патологии при инфицировании вирусом простого герпеса, цитомегаловирусом, хламидиями, кандидами [64], ВИЧ инфекции при вирусе простого герпеса [65], малярии [66].

В других случаях наблюдается обратное состояние – ингибирующее влияние одного, как правило, менее агрессивно текущего патологического процесса на течение и исход другого, что, на наш взгляд, реализует принцип ПостК в патогенезе коморбизма. Так, Гиппократ отмечал, что «при сумасшествии дизентерия, или водянка, или экстаз – хорошо» [54], «лихорадка, являющаяся у пораженного судорогой или столбняком, разрешает болезнь» [54] или «если у кого печень кругом болит, то у таких наступающая лихорадка разрешает болезнь» [54]. Среди современных примеров такого ослабления – классические наблюдения М.В. Черноруцкого [67] в период блокады Ленинграда особенностей течения внутренней патологии (стенокардии, БА, суставного ревматизма, экссудативного плеврита, пищевой аллергии) при сочетании с алиментарной дистрофией. Сегодня подобное снижение интенсивности одного из заболеваний при сопутствующей патологии отмечено при сочетании туберкулеза легких и ИБС [68], БА и сахарного диабета типа 2 («Астма – это антидиабет» – образное выражение проф. Г. Б. Федосеева), а также ИБС на фоне БА [69] и гипотиреоза [70]. Подобное нередко и при инфекционной патологии. Как правило, отмечается более доброкачественное течение инфекционного мононуклеоза при гриппе и острой герпетической инфекции [62], эндогенных атопических заболеваний при гельминтной инвазии Opisthorhis и Toxocara [64]. Ярким примером такого рода является совместное течение инфекции иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ) и клещевого энцефалита (КЭ). В этом случае очаговая неврологическая симптоматика, свойственная последнему, обнаруживается крайне редко (у 2% пациентов – в сравнении с 34% при моноинфекции КЭ) [71], а выраженность вирусно-бактериального процесса оказывается более мягкой, чем при изолированной вирусной инфекции [72, 73]. На этом же примере коморбидности можно наблюдать и определенную «дозозависимость» прекондиционирующего эффекта. Известно, что эритемная форма ИКБ имеет сравнительно более тяжелое течение, чем безэритемная. При этом течение КЭ при микст-инфекции с ИКБ эритемной формы протекает заметно легче, чем сочетание КЭ с ИКБ безэритемного течения [74]. Подобный результат наблюдается и в коморбизме острых инфекций, в частности, кишечных. Так, дизентерия оказывает протективный эффект при последующей сальмонеллезной инфекции [75].

В ряде случаев сложно предположить, по пре- или посткондиционирующему механизму происходит облегчение клинического течения одной из инфекций при микст-патологии. Так, учитывая продолжительность инкубационного периода обеих инфекций, невозможно определить механизм более доброкачественного течения гепатита В при наличии инфекции вируса гепатита С в сравнении с течением одного гепатита В [76, 77]. Вероятно, с посткондиционирующим эффектом связан известный в терапии клинический феномен более благоприятного прогноза дальнейшего течения бактериальной пневмонии при реактивации вируса простого герпеса – с момента появления характерных высыпаний. Автор статьи наблюдал пациентку, молодую женщину 37 лет, истощенную хроническим течением БА, диффузным нейродермитом и рецидивирующим генитальным герпесом, с признаками вторичной иммунологической недостаточности, у которой очередной герпетический эксцесс тут же приводил к значительному облегчению течения БА (отхождению мокроты, заметному улучшению дыхания).

На эффекте ПостК в условиях коморбизма был основан использовавшийся в прошлом в лечебных целях метод искусственно вызываемого состояния микст-инфекции. Так, в начале XX века – в доантибиотиковый период – лечение прогрессирующего нейросифилиса активно проводилось биологическим способом малярио-

терапии. Контролируемые с помощью хинина рецидивы малярийной лихорадки обеспечивали полное излечение или значительный регресс симптоматики нейросифилиса с переходом в латентную стадию. Заметим, что автор метода – венский невролог и психиатр Юлиус Вагнер-Яурегг – в 1927 году за это открытие был удостоен Нобелевской премии [78]. Существовали различные мнения относительно механизмов эффективности искусственно вызванной лихорадки – антагонистическое взаимодействие двух возбудителей, Reiztherapie (терапия раздражением), спирохетоцидное действие малярийной гипертермии [79], но открытие пенициллина оставило этот вопрос нерешенным.

Эмпирическое использование феноменов ПреК и ПостК в клинической фармакологии и терапии

Принцип ПреК лежит в основе способа приема ряда высокоактивных лекарственных средств, которые обладают токсическими свойствами или выраженными побочными эффектами. Хрестоматийным примером является легенда о царе Митридате, систематически принимавшем из опасения быть отравленным микродозы яда в чашке сливок. Эта история нашла отражение в художественной литературе в действиях героя А. Дюма графа Монте-Кристо: «…Но только помните: в маленькой дозе – это лекарство, в большой дозе – яд. Одна капля возвращает к жизни, … пять или шесть неминуемо принесут смерть…». С постепенным увеличением дозы ранее рекомендовался прием препаратов мышьяка (сальварсан), железа, ртути (каломель), а сегодня – никотиновой кислоты, современных психотропных (флуоксетин), нейротропных (акатинола мемантин), иммунотропных (иммуноглобулины), антигипертензивных, ряда гормональных и др. средств.

Когда имеется представление о фармакокинетических свойствах некоторых лекарственных растений, становится понятным, что часть из них оказывает свое воздействие также по механизму ПостК. Ревень и алоэ (сабур) в больших дозах у здоровых людей оказывают раздражающее действие на слизистую оболочку кишечника, вызывая экссудативное воспаление, проявляющееся расстройством стула [80]. В то же время издавна известно противовоспалительное и закрепляющее действие малых доз этих растений при диарее [81, 82]. Слабый настой чая – традиционное средство для предотвращения волнения и сердцебиения, возникающих от выраженного эмоционального напряжения, в то время как крепкий настой чая у здоровых субъектов вызывает учащение сердечного ритма. Соглашаясь с целесообразностью назначения малых доз кофеина (классического средства, стимулирующего ЦНС) при бессоннице у больных с возбужденной нервной системой, академик И.П. Павлов тем самым одним из первых обсуждал принцип ПостК в клинической фармакологии (см. «Павловские среды», стр. 302–303, [83]). Все эти наблюдения – примеры фармакологической (фитотерапевтической) индукции феномена ПостК.

Сочетание законов подобия и малых доз, являющееся основой гомеопатического принципа лечения, – уникальное в своем роде развитие идеи ПостК в самостоятельную лечебную теорию в доэкспериментальном периоде развития медицины. Основной постулат гомеопатической медицины был выдвинут более 200 лет тому назад С. Ганеманом: «…лекарства могут излечивать болезни только посредством своих болезнетворных сил на здоровый организм, <…> симптомы тех и других явлений должны быть сходны между собою» [84]. По закону подобия, тождественному принципу ПостК, действует как в гомеопатической, так и в аллопатической медицине целый ряд проверенных и надежных лекарственных средств: йод, препараты железа, сера, мышьяк, камфара, наперстянка, сенна, календула, черника и др. [82, 85, 86]. Так, мышьяк при хронических отравлениях (например, сальварсаном при лечении сифилиса), проявляющихся полисимптомной клиникой с наличием полиморфной сыпи и мучительного зуда, долгое время использовался в дерматологии как в гомеопатии (Arsen D6-D3), так и как фармакологический препарат в виде пилюль («азиатские пилюли») при лечении красного плоского лишая, псориаза и других заболеваний [87].

Эффективность распространенных ранее контрастных «зигзагообразных» диет (дни с резким ограничением белка, углеводов, соли или только сыроедения, молочные) при хронических дерматозах (крапивница, кожная экзема, болезнь Дюринга и пр.) также может объясняться с позиции принципа ПостК [87].

Можно считать, что лечение голодом (разгрузочно-диетическая терапия), являясь методом системного воздействия, активирует саногенетические процессы при хронических заболеваниях (ожирении, атеросклерозе, аутоиммунной патологии и др.) по принципу ПостК [88]. Эффекты известных и прекрасно зарекомендовавших себя физиотерапевтических и биологических методик (аутогемотерапии, классического массажа, русской парной бани, желтых скипидарных ванн по методу А.С. Залманова, холодового закаливания, средств раздражающего воздействия – мазей со змеиным ядом, растительными эфирными маслами, медицинских банок, горчичников, пчелоужаления, а также давно забытых заволоков и фонтанелей) по своей сути являются способами воздействия на организм больного по принципу ПостК.

Метод гипосенсибилизирующей терапии, применяемый для «привыкания» к установленному аллергену при лечении кожных болезней [87], у больных с БА [89], идея дыхательных упражнений по авторским методикам Н.А. Стрельниковой, К.П. Бутейко, В.Ф. Фролова – примеры интуитивного использования принципа ПостК в решении вопроса профилактики и реабилитации немедикаментозными методами в современной восстановительной медицине. Тактика постепенной рекомпрессии для лечения и профилактики развития декомпрессионной (кессонной) болезни – пример применения принципа ПостК в медицине чрезвычайных ситуаций.

Принимая во внимание механизм действия «тканевой терапии», эффект лечения келоидных рубцов, опоясывающего лишая, экзем, стоматитов экстрактами алоэ или стекловидного тела [87] становится объяснимым с позиции принципа ПостК.

С точки зрения идеи ПостК любопытна рекомендация старых оториноларингологов при «слабом горле» у часто болеющих субъектов (для профилактики обос-

трений хронического тонзиллита и фарингита) регулярно глотать кусочки льда с целью закаливания слизистой верхних дыхательных путей в холодное время года [90].

Реализуемый в рамках эмоционально-стрессового воздействия принцип ПостК лежит в основе одного из распространенных нефармакологических направлений коррекции душевных расстройств. Так, метод «поведенческой» (условнорефлекторной) психотерапии, разработанный В.М. Бехтеревым и названный им «сочетательно-рефлекторной терапией» [91], подразумевает создание искусственного психотравмирующего состояния (демонстрация условного стимула – объекта страха – без подкрепления). Существует опыт применения различных его вариантов (иммерсии, наводнения, имплозии) в психотерапии при истерических параличах, глухоте, слепоте, ночном недержании мочи, затяжных неврозах, в частности, навязчивых состояниях, тревожно-фобических, обсессивно-фобических расстройствах, изолированных невротических монофобиях (больной с танатофобией слушает рассказ о своей смерти) [92], хроническом алкоголизме (аверсионая терапия с проведением дитилинового блока). На основе этого принципа строится система психологических тренировок, действующих для ослабления страха у здоровых субъектов в предполагаемых психопатогенных ситуациях (подготовка террористов-смертников, воспитание японских самураев).

Эффекты пре- и посткондиционирования в различных областях современной медицины

В кардиологии. Открытие в эксперименте феномена ПреК миокарда группой R. Jennings в 1986 г. положило начало целой эпохе интенсивного изучения данного явления, а первая публикация в журнале Circulation, посвященная ПреК, стала наиболее цитируемой в области кардиологии за последние 10 лет [93]. К настоящему времени показаны инфаркт-лимитирующий [93], эндотелиопротективный [94], а также антиаритмический эффекты ПреК в отношении как ишемических, так и реперфузионных тахиаритмий [95].

Феномен ПостК миокарда был обнаружен Z.Q. Zhao и соавт. в 2003 г. [96], хотя считается, что он имеет более глубокие исторические корни в виде так называемой концепции «модифицированной реперфузии» [97]. Согласно этому направлению, описанному в конце 80-х годов, изменение условий реперфузии миокарда после периода ишемии с помощью постепенного восстановления кровотока позволяет добиться существенного уменьшения степени реперфузионного повреждения.

Большой интерес представляют перспективы проведения фармакологического ПреК и ПостК миокарда. Так, введение таких фармакологических кардиопротективных агентов, как эритропоэтин, агонист аденозиновых рецепторов AMP579, трансформирующий фактор роста-β и инсулин, в ходе реперфузии вызывает выраженный инфаркт–лимитирующий эффект, сопоставимый с эффектом ПреК [98]. Предполагается, что ПреК и ПостК имеют общие механизмы, которые реализуются в первые минуты реперфузии после продолжительной ишемии [98].

Несмотря на то, что механизмы ишемического ПреК к настоящему времени уже достаточно подробно изучены, данный защитный феномен так и не нашел широкого применения в клинической практике. Основной причиной отсутствия «трансляции» ПреК в клиническую медицину стала невозможность предсказания времени начала острой тромботической окклюзии инфаркт-зависимой коронарной артерии у пациентов со стабильной и нестабильной стенокардией. Поэтому ПреК миокарда, многократно воспроизведенное в экспериментальных исследованиях на всех видах животных, так и осталось заманчивым, но не внедренным в клинику методом повышения устойчивости сердца к ишемии.

Напротив, феномен ПостК миокарда сразу вызвал очень большой интерес клиницистов. Перспективность его практического применения в том, что воздействие выполняется уже после эпизода состоявшейся ишемии миокарда, и тем самым может быть легко регулируемым. Если первая работа по клиническому применению ПреК вышла в свет лишь через 8 лет после его описания, то ПостК было внедрено в практику уже через 2 года после открытия и успешно использовано при выполнении чрескожных коронарных вмешательств по поводу острого коронарного синдрома [99].

Таким образом, интенсивные исследования ПреК и ПостК в кардиологии сформировали общую систему взглядов на эти феномены и позволили применить их в других областях медицины.

В неврологии. Впервые феномен ПреК на мозге был показан в 1990 г. при ишемии в бассейне сонных артерий у монгольских песчанок [100]. Чуть позже были обнаружены эффекты ПостК на мозге [101]. Однако еще в начале XX века проводились исследования по влиянию гипоксии на головной мозг, хотя термина «прекондиционирование» еще не существовало и явление называлось «тренировкой» и «толерантностью к ишемии». В клинических условиях стимулами, вызывающих нейтротропные пре – и посткондиционирующие эффекты, могут служить как транзиторные ишемические атаки до или после больших инсультов, так и короткие эпизоды ятрогенной ишемии [102], системное воспаление [103], гипербарическая оксигенация [104], гипо– и гипертермия [105], эпилептические припадки [106], распространенная корковая депрессия [107], метаболические и фармакологические агенты [108].

Таким образом, очевидно, что в неврологии давно интуитивно чувствовалось приложение этих феноменов для лечения заболеваний нервной системы. Так, например, гипербарическая оксигенация [104] и гипотермия [105] в посткондиционирующем режиме применялись в раннем периоде инсульта после реперфузии мозга, что приводило к уменьшению неврологического дефицита и улучшению общего состояния больного.

Примечательно, что защитные механизмы эффекта ПреК в головном мозге в сравнении с миокардом имеют ряд принципиальных различий. Так, в головном мозге защитный эффект ПреК проявляется при ишемии, продолжающейся 60 мин. и более вплоть до перманентной (!) ишемии [109]. Напротив, в сердце важнейшим условием проявления феномена ПреК является запуск реперфузии в течение 60–120 минут от момента старта ишемического

состояния. Другой особенностью ПреК головного мозга является открытие коллатералей, уменьшающее размер зоны факультативного некроза (зоны ишемии) [110]. Для мозга, в отличие от сердца и других тканей, свойственны защитные эффекты не только раннего, но и позднего ишемического ПостК (через 3, 6, 12 часов после начала реперфузии) [111], что связано с особенностями его органного кровообращения и метаболизма. По контрасту, в сердце крысы защитный эффект ПостК утрачивается при отсрочке его выполнения уже на 1 минуту от момента начала реперфузии [112].

К сожалению, несмотря на то, что ПреК и ПостК являются эффективными способами нейропротекции, они не имеют широкого применения в клинике. Сегодня ПреК мозга используют, главным образом, при операциях на сосудах головы и шеи (эндартерэктомия, клипирование аневризм, артериовенозных мальформаций). Широкие перспективы открываются для использования таких фармакологических индукторов ПреК мозга, как эритропоэтин [113] и статины [114].

В гастроэнтерологии. Имеющиеся литературные данные свидетельствуют о возможности уменьшения ишемического и реперфузионного повреждения тонкой кишки посредством ишемического ПреК и ПостК. Анализ совокупности белков гомогената кишки после ПостК показал повышенный уровень экспрессии белков, участвующих в энергетическом метаболизме клетки, антиоксидантов и антиапоптотических факторов [115]. Примечательно, что выполнение дистантного ишемического ПреК путем кратковременной окклюзии инфраренальной аорты перед последующей продолжительной ишемией хвоста поджелудочной железы уменьшало степень повреждения последней [116].

В работах последних лет, посвященных защите печени и поджелудочной железы, метод ПреК обсуждается как средство повышения качества органных трансплантатов перед их консервацией [117]. Небольшой, но многообещающий опыт стентирования брыжеечной артерии у пациентов с острым мезентериальным тромбозом [118] позволяет надеяться, что впоследствии у данной категории пациентов может с успехом применяться процедура ишемического и/или фармакологического ПостК тонкой кишки.

В оториноларингологии. В сравнении с кардиологией и неврологией существуют лишь единичные исследования ПреК при экспериментальной патологии улитки. Для улитки тоже продемонстрировано положение об универсальности ишемического ПреК [119]. Прекондиционирующий эффект малых экспозиций безусловно отоповреждающих факторов (акустического шума, салицилатов, аминогликозидов, петлевых диуретиков) показан на моделях острого сенсоневрального повреждения слухового анализатора *in vivo* (цисплатиновой и аминогликозидной ототоксичности, шумовой травмы) [120–125].

Среди современных методов лечения ЛОР-органов принципы ПреК и ПостК не реализованы, несмотря на то, что имеются значительные перспективы для их применения. Прежде всего, это ятрогенные нарушения слуха и профессиональная тугоухость в результате шумовой болезни. Представляется, что консервативные воздействия на основе принципа ПреК (прежде всего фармакологического) могут быть применимы при воспалительной ЛОР патологии, ассоциированной с хронической персистенцией респираторной герпес-вирусной микстинфекцией, при лечении хронических, субатрофических процессов слизистой носоглотки, околоносовых пазух, спаечных процессов в среднем ухе.

Актуальность применения пре- и посткондиционирования в клинической медицине

Вопрос внедрения в клинику методов профилактики и лечения, основанных на принципах ПреК и ПостК, сохраняет свою актуальность. Для уточнения места ПреК среди существующих терапевтических средств данный феномен следует обозначить как вариант консервативного воздействия стимулирующего свойства с опосредованным механизмом действия (табл. 4).

Важность понимания стимулирующего характера лечебного воздействия, основанного на принципе ПреК, определяется возможностью возникновения ятрогенных

Таблица 4

Место пре- и посткондиционирования в общей структуре основных видов лечебных консервативных воздействий

1. Ингибирующая терапия, в т. ч.:
– антигипертензивные средства;
– противовоспалительные средства (НПВС, антигистаминные препараты, глюкокортикоиды и пр.);
– противомикробные средства;
– цитостатики;
– антагонисты рецепторов гормонов.
2. Заместительная терапия при абсолютном или относительном дефиците:
– гормональная коррекция;
– метаболическая коррекция.
3. Стимулирующие воздействия в условиях патологической функциональной активности:
А) С прямым механизмом действия:
– инотропные средства (сердечные гликозиды, адреномиметики);
– нормотимики (вальпроевая кислота);
– ряд слабительных средств (бисакодил);
Б) С опосредованным механизмом действия:
– гомеопатическая концепция;
– физиотерапевтические воздействия;
– пре- и посткондиционирование.

обострений хронической патологии, а опосредованного механизма – определением показаний к его применению (по характеру патогенеза и течения патологии). Феномен ПреК может быть реализован только в условиях сохранных адаптационных возможностей, что при хронической патологии наблюдается в случае стабильного течения (вне обострения) и при отсутствии глубоких дегенеративных изменений.

Основные перспективы применения феноменов параальтернативной защиты в практических условиях, очевидно, связаны с использованием защитного эффекта физического и фармакологического вариантов ПреК и ПостК, способных вызывать биохимические изменения, эквивалентные классическому (ишемическому) способу достижения. Внедрение таких способов органопротекции имеет принципиальное значение для клинической практики, поскольку их терапевтическое применение легко дозируемо, управляемо и, соответственно, безопасно. С другой стороны, следует учитывать, что эти воздействия не способны вызывать весь цитопротективный каскад биохимических перестроек клеточного гомеостаза, свойственный классическому (ишемическому) стимулу, и, следовательно, могут оказаться не столь эффективными.

С позиций феноменов параальтернативной защиты целесообразно пересмотреть самые темные и скромно замалчиваемые вопросы современной терапии, а именно:

Механизмы развития так называемого «первичного терапевтического обострения» (фармако-, фитотерапевтического, гомеопатического) при лечении хронической патологии;

Поиск оптимальной последовательности консервативных (медикаментозных и немедикаментозных) назначений с целью получения наибольшего эффекта при хронической рецидивирующей патологии.

Целесообразность проведения и объем активного лечебного воздействия при компенсированных хронических патологических процессах.

Дифференцированное назначение физических и фармакологических способов достижения феноменов параальтернативной защиты может внести существенный вклад в оптимизацию стратегии вторичной профилактики метаболических заболеваний (сахарного диабета, ожирения, подагры), аутоиммунной патологии (БА, неспецифического язвенного колита, псориаза, ревматоидного артрита), неврологической патологии (рассеянного склероза, дисциркуляторной энцефалопатии, болезни Паркинсона, фантомного синдрома), хронической сенсоневральной тугоухости, рецидивирующих хронических вирусных инфекций (семейства вирусов гепатита, герпеса, ВИЧ, нейроинфекции и др.). Кажется перспективным внедрение методов параальтернативной защиты в тактику лечения онкологической патологии. Во-первых, в этом аспекте крайне актуален вопрос подчинения опухоли законам ПостК – возможности селективного устранения ткани новообразования. Во-вторых, целесообразно изучение возможности потенциации эффектов полихимиотерапии, хирургического и лучевого лечения опухолей, а также профилактики ятрогений при облигатном фармакотерапевтическом воздействии с органоповреждающими осложнениями (ото-, миело- и кардиотоксичность) с помощью ПостК. Интригует реальность применения методов ПреК в профилактике прогрессии генетических, быстро прогредиентных заболеваний (детская доречевая коннексиновая глухота, синдром Ушера, муковисцидоз, миопатии, гемохроматоз, болезнь Вильсона-Коновалова и пр.).

Обсуждая перспективы применения феноменов параальтернативной защиты, следует отметить, что эти принципы уже сегодня целенаправленно используются в построении стратегии саногенетической терапии при некоторых конкретных клинических ситуациях. Так, например, показаны хорошие результаты применения ишемического ПреК при кардиохирургических вмешательствах в условиях кардиоплегии и экстракорпорального кровообращения [126, 127], при ангиопластике и стентировании сонных артерий у пациентов с хронической ишемией головного мозга [128]. Ишемическое и фармакологическое ПостК находят свое место при чрескожных коронарных вмешательствах у пациентов с острым коронарным синдромом [129–130].

Заключение

Таким образом, параальтернативные феномены ПреК и ПостК – это не просто экспериментальные явления, а универсальные для живой природы защитные механизмы. Законы ПреК и ПостК являются принципиальной основой построения теории физических тренировок, формирования особенностей течения заболеваний при коморбизме, а также консервативного лечения и интраоперационной защиты различных органов.

Однако на сегодняшний день принципы ПреК и ПостК практически не используются в рутинной терапевтической практике, а их исследование, как правило, не выходит за рамки экспериментальных работ. При этом очевидно, что в каждой области медицины они актуальны в направлении дифференцированного устранения патологического субстрата, профилактики обострений или дегенерации, сокращения полипрагмазии, выбора альтернативных подходов к лечению.

Авторы выражают благодарность доценту К.В. Нурскому за советы при чтении рукописи. Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ по государственной поддержке ведущих научных школ (НШ-2359.2012.7), а также гранта ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг. (государственный контракт № П607 от 18 мая 2010 г.)

Литература

1. *Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A.* Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium // Circulation. 1986. – Vol. 74, № 5. – P. 1124–1136.

2. *Петрищев Н.Н., Шляхто Е.В., Власов Т.Д., Галагудза М.М.* Ишемическая адаптация миокарда: патофизиологические механизмы и возможные перспективы практического применения (обзор литературы) // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2001. – Т. 87, № 5. – С. 688-706.

3. *Bolli R., Li Q. H., Tang X. L. et al.* The late phase of preconditioning and its natural clinical application-gene therapy // Heart Fail. Rev. – 2007. – Vol. 12, № 3-4. – P. 189–199.

4. *Маслов Л.Н., Криг Т., Дайван В.* Посткондиционирование – универсальный защитный феномен // Пат. физиол. и эксп. терапия. – 2009, № 3. – С. 2–6.

5. *Zhao Z.Q., Corvera J.S., Halkos M.E. et al.* Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2003. – Vol. 285, № 2. – P. H579–H588.

6. *Galagudza M.M., Blokhin I.O., Shmonin A.A., Mischenko K.A.* Reduction of myocardial ischemia-reperfusion injury with pre- and postconditioning: molecular mechanisms and therapeutic targets // Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets. – 2008 –. Vol. 8, № 1. – P. 47–65.

7. *Мойбенко А.А., Досенко В.Е., Пархоменко А.Н.* Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца. – Киев: Наук. думка, 2008. – 520 с.

8. *Петрищев Н.Н., Власов Т.Д., Галагудза М.М.* Саногенетические процессы при ишемической болезни сердца // В кн.: Саногенез (о науке и практике врачевания). – СПб.: ЭЛБИ-СПБ, 2009. – 238 с.

9. *Филатов В.П.* Тканевая терапия (лечение биогенными стимуляторами). Ташкент, 1948. 207 с.

10. *Филатов В.П.* Мои пути в науке. – Одесса, 1955. – 162 с.

11. *Петрищев Н.Н., Цырлин В.А., Власов Т.Д. и др.* Комплексная оценка кардиопротективного действия феномена ишемической адаптации: влияние глубины ишемии на реализацию антиаритмического эффекта // Мед. акад. журнал. – 2001. – Т. 1, № 2. – С. 14–21.

12. *Vlasov T.D., Korzhevskii D.E., Polyakova E.A.* Ischemic preconditioning of the rat brain as a method of endothelial protection from ischemic/reperfusion injury // Neurosci. Behav. Physiol. – 2005. – Vol. 35, № 6. – P. 567–572.

13. *Desai K.K., Dikdan G.S., Shareef A., Koneru B.* Ischemic preconditioning of the liver: a few perspectives from the bench to bedside translation // Liver Transpl. – 2008. – Vol. 14, № 11. – P. 1569–1577.

14. *Ferencz A., Racz B., Gasz B. et al.* Intestinal ischemic preconditioning in rats and NF-kappaB activation // Microsurgery. – 2006. – Vol. 26, № 1. – P. 54–57.

15. *Takeda S., Hata R., Cao F. et al.* Ischemic tolerance in the cochlea // Neurosci. Lett. – 2009. – Vol. 462, № 3. – P. 263–266.

16. *Шляхто Е.В., Галагудза М.М., Сыренский А.В., Нифонтов Е.М.* Кардиопротективные эффекты феномена ишемического посткондиционирования миокарда // Кардиология. 2005. – Т. 45, № 7. – С. 44–48.

17. *Zhao H.* Ischemic postconditioning as a novel avenue to protect against brain injury after stroke // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2009. – Vol. 29, № 5. – P. 873–885.

18. *Lucats L., Chalvignac V., Bizé A. et al.* Rapid ventricular pacing induces delayed cardioprotection against myocardial stunning // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2005. – Vol. 39, № 6. – P. 849–855.

19. *La Rue A.* Healthy brain aging: role of cognitive reserve, cognitive stimulation, and cognitive exercises // Clin Geriatr Med. – 2010. – Vol. 26, № 1. – P. 99–111.

20. *Dirnagl U., Becker K., Meisel A.* Preconditioning and tolerance against cerebral ischemia: from experimental strategies to clinical use // Lancet Neurol. – 2009. – Vol. 8, № 4. – P. 398-412.

21. *Theneshkumar S., Lorito G., Giordano P. et al.* Effect of noise conditioning on cisplatin-induced ototoxicity: a pilot study // Med. Sci. Monit. – 2009. – Vol. 15, № 7. – P. 173-177.

22. *Sha S.H., Schacht J.* Salicylate attenuates gentamicin-induced ototoxicity // Lab. Invest. – 1999. – Vol. 79, № 7. – P. 807–813.

23. *Ding D., McFadden S.L., Browne R.W., Salvi R.J.* Late dosing with ethacrynic acid can reduce gentamicin concentration in perilymph and protect cochlear hair cells // Hear Res. – 2003. – Vol. 185, № 1–2. – P. 90–96.

24. *Oliveira J.A., Canedo D.M., Rossato M., Andrade M.H.* Self-protection against aminoglycoside ototoxicity in guinea pigs // Otolaryngol. Head Neck Surg. – 2004. – Vol. 131, № 3. – P. 271–79.

25. *Takeda S., Hata R., Cao F. et al.* Ischemic tolerance in the cochlea // Neurosci. Lett. – 2009. – Vol. 462, № 3. – P. 263–266.

26. *Меерсон Ф.З.* Адаптация к периодической гипоксии в терапии и профилактике. – М.: Наука, 1989. – 70 с.

27. *Селье Г.* Очерки об адаптационном синдроме. М., 1960. 254 с.

28. *Зыбелин С.Г.* Слово о вреде, проистекающем от содержания себя в теплоте излишней. – М., 1773. – 35 с.

29. *Лазарев Н.В., Люблина Н.И., Розин М.А.* Состояние неспецифически повышенной сопротивляемости // Патол. физиол. и эксп. терапия. – 1959. – № 4. – С. 16–21.

30. *Ланг Г.Ф.* Гипертоническая болезнь. – М., 1950. – 496 с.

31. *Singhal A.B.* Oxygen therapy in stroke: past, present, and future // Int. J. Stroke. – 2006. – Vol. 1, № 4. – P. 191–200.

32. *van der Worp H.B., Macleod M.R., Kollmar R.* Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: ready to start large randomized trials? // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2010. – Vol. 30, № 6. – P. 1079–1093.

33. *Юрьев П.П.* О компенсаторной гипертрофии почки. – СПб, 1899. – 36 с.

34. *Pfeffer M.A., Braunwald E.* Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications // Circulation. – 1990. – Vol. 81. – P. 1161–1172.

35. *Mattson M.P.* Hormesis defined // Ageing Res. Rev. – 2008. – Vol. 7, № 1. – P. 1–7.

36. *Кубышкина И.В.* Гелиогеофизические факторы и ЛОР-болезни // Вестн. оториноларинг. – 1998. – № 6. – С. 54–56.

37. *Вишнякова Л.А., Васильева М.Г.* Изучение микрофлоры дыхательных путей у больных бронхиальной астмой при проведении разгрузочно-диетической терапии // В сб.: Разгрузочно-диетическая терапия –. Л., 1978. – С. 26–34.

38. *Чернякова Д.Н., Осинин С.Г., Федосеев Г.Б., Шафировский Б.Б.* Клинико-морфологическое исследование слизистой бронхов больных бронхиальной астмой в процессе лечения // Тер. арх. – 1983. – № 9. – С. 19–22.

39. *Чернякова Д.Н., Осинин С.Г., Паламарчук Г.Ф., Чижова О.Ю.* Изменение слизистой оболочки бронхиального дерева у больных бронхиальной астмой в процессе разгрузочно-диетической терапии // В кн.: Немедикаментозные методы в лечении и реабилитации больных неспецифическими заболеваниями легких. – Л., 1989.

40. *Титов А.Ф., Акимова Т.В., Таланова В.В., Топчиева Л.В.* Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. – М., 2006. – 143 с.

41. *Генкель П.А.* Методические указания по предпосевному закаливанию растений против засухи. – М., 1968. – 24 с.

42. *Николаева М.Г., Лянгузова И.В., Поздова Л.М.* Биология семян. – СПб., 1999. – 232 с.

43. *Ефименко П.С.* Обычаи и верования крестьян Архангельской губернии. – М., 2009. – 557 с.

44. *Ганеман С.* Органон врачебного искусства или основная теория гомеопатического лечения. – СПб., 1992. – 141 с.

45. *Блау Л.* Диагностика и терапия при угрожающих опасностью болезненных симптомах. – Т. 2. – СПб.: Практическая медицина, 1885. – 520 с.

46. *Гебра Ф.* Болезненные изменения кожи и ее придаточных образований с рассмотрением отношений их к болезням всего организма. – СПб., 1885. – 540 с.

47. *Попов Г.* Народно-бытовая медицина. – М., 1998. – 375 с.

48. *Торэн М.Д.* Русская народная медицина и психотерапия. – СПб, 1996. – 496 с.

49. *Dickson E.W., Lorbar M., Porcaro W.A. et al.* Rabbit heart can be «preconditioned» via transfer of coronary effluent // Am. J. Physiol. – 1999. – Vol. 277, № 6. – P. H2451–H2457.

50. *Эфроимсон В.П.* Гениальность и генетика. – М.: Русский мир, 1988. – 544 с.

51. *Довжанский С.И, Утц С.Р.* Псориаз или псориатическая болезнь. ч. 2. – Саратовск. университет, 1992. – 173 с.

52. *Kloner R.A., Muller J., Davis V.* Effects of previous angina pectoris in patients with first acute myocardial infarction not receiving thrombolytics // Am. J. Cardiol. – 1995. – Vol. 75. – P. 615–617.

53. *Мойбенко А.А., Досенко В.Е., Пархоменко А.Н.* Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца. – Киев: Наук. думка, 2008. – 520 с.

54. *Гиппократ.* Избранные книги. – М., 1994. – 736 с.

55. *Кароли Н.А., Ребров А.П.* Хроническая обструктивная болезнь легких и ишемическая болезнь сердца // Клин. мед. – 2005. – № 6. – С. 72–76.

56. *Кароли Н.А., Орлов Е.Е., Маркова А.В., Ребров А.П.* Коморбидность при хронической обструктивной болезни легких // Тер. арх. – 2008. – Т. 80, № 3. – С. 20–23.

57. *Авдеев С.Н., Баймаканова Г.Е.* ХОБЛ и сердечно-сосудистые заболевания: механизмы ассоциации // Пульмонология. – 2008. – № 1. – С. 5–13.

58. *Чучалин А.Г.* Хроническая обструктивная болезнь легких и сопутствующие заболевания // Пульмонология. – 2008. – № 2. – С. 5–14.

59. *Лиознов Д.А.* Клинико-патогенетические особенности дизентерии Флекснера у больных, злоупотребляющих алкоголем /// Учен. зап. СПбГМУ. – 2000. – Т. 31. – С. 95–97.

60. *Miguel A., Garcia-Ramon R., Perez-Contreras J. et al.* Comorbidity and mortality in peritoneal dialysis: a comparative study of type 1 and 2 diabetes versus nondiabetic patients. Peritoneal dialysis and diabetes // Nephron. – 2002. – Vol. 90, № 3. – P. 290–296.

61. *Пауков В.С., Попова И.В., Огурцов П.П. и др.* Морфологические особенности хронической гепатопатии при сочетании HCV-инфекции и хронической алкогольной интоксикации // Арх. пат. – 2001. – № 2. – С. 16–20.

62. *Букина А.Ф.* Клинико-этиологические аспекты и новые подходы к терапии инфекционного мононуклеоза у детей: Автореф. дис. … канд. мед. наук. – СПб, 2000. – 22 с.

63. *Лобанова Ю.В., Петрова М.А.* Особенности формирования, течения и лечения бронхиальной астмы и язвенной болезни в условиях их сочетания // Бол. орг. дыхания. – 2008. – № 1. – С. 11–15.

64. *Козина О.В.* Роль инфекции, вызванной вирусом простого герпеса, и микст-инфекции при атопии: Автореф. дис. … канд. мед. наук. – Томск, 2002. – 37 с.

65. *Sheth P.M., Sunderji S., Shin L.Y. et al.* Coinfection with herpes simplex virus type 2 is associated with reduced HIV-specific T cell responses and systemic immune activation // J. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 197, № 10. – P. 1394–1401.

66. *Xiao D., Bossert W.H.* An intra-host mathematical model on interaction between HIV and malaria // Bull Math Biol. – 2010. – Vol. 72, № 7. – P. 1892–1911.

67. *Черноруцкий М.В.* Алиментарная дистрофия в блокированном Ленинграде. – Л., 1947. – 336 с.

68. *Дитятков Ф.Е., Радзевич А.Э., Ситникова Н.А., Тихонов В.А.* Особенности ишемической болезни сердца у больных туберкулезом легких // Пробл. туберк. и бол. легких. – 2006. – № 1. – С. 42–44.

69. *Гембицкий Е.В., Синопальников А.И., Алексеев В.Г.* Бронхиальная астма и ишемическая болезнь сердца – новый взгляд на актуальную проблему // Клин. мед. – 1987. – № 9. – С. 38–44.

70. *Терещенко И.В., Цепелев В.В., Иванова Э.С.* О субклиническом гипотиреозе у больных ишемической болезнью сердца // Кардиология. – 1993. – № 11. – С. 45-47.

71. *Усков А.Н.* Смешанные инфекции, передающиеся иксодовыми клещами в Северо-Западном регионе России (клиника, диагностика, лечение): Автореф. дис. … докт. мед. наук. – СПб, 2003. – 43 с.

72. *Цинзерлинг В.А., Чухловина М.Л.* Инфекционные поражения нервной системы: Вопросы этиологии, патогенеза, диагностики. – СПб, 2005. – 448 с.

73. *Ибатулин Р.А., Магжанов Р.В., Туник В.Ф.* Клинические проявления клещевого боррелиоза в республике Башкортостан // Неврол. вестник. – 2007. – Т. 39, № 1. – С. 71–74.

74. *Гордеец А.В., Черникова А.А., Савина О.Г. и др.* Клиника сочетанных инфекций в Приморье // Тихоокеанский мед. журнал. – 2008. – № 3. – С. 50–52.

75. *Матюхин А.В.* О сочетанных формах дизентерии и сальмонеллеза // Клин. мед. – 2007. – № 4. – С. 60–63.

76. *Dumoulin F.L, von dem Bussche A., Li J. et al.* Hepatitis C virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and viral promoters in hepatic and nonhepatic cell lines // Virology. – 2003. – Vol. 305, № 2. – P. 260–266.

77. *Chu C.M., Sheen I.S., Liaw Y.F.* Low-level hepatitis C viremia and humoral immune response to NS4 in chronic hepatitis B virus-hepatitis C virus coinfection // Scand. J. Gastroenterol. – 2004. – Vol. 39, № 8. – P. 778–782.

78. *Марьянович А.Т., Князькин И.В.* Взрыв и цветение: Нобелевские премии по медицине, 1901–2002. – СПб, 2002. – 800 с.

79. *Кроль М.Б., Маргулис М.С., Проппер Н.И.* Учебник нервных болезней. – М.-Л., 1934. – Т. II. – 668 с.

80. *Вавилова Н.М.* Гомеопатическая фармакодинамика. – Смоленск, 1994. – Т. 2. – 470 с.

81. *Ковалева Н.Г.* Лечение растениями. Очерки по фитотерапии. – М., 1971. – 351 с.

82. *Палов М.* Энциклопедия лекарственных растений. – М., 1998. – 467 с.

83. Павловские среды: Протоколы и стенограммы физиологических бесед. – М.-Л., 1949. – Т. II. – 625 с.

84. *Ганеман С.* Органон врачебного искусства или основная теория гомеопатического лечения. – СПб, 1992. – 141 с.

85. *Кравков Н.П.* Основы фармакологии. 10-е изд. – М.-Л., 1928. – Т. 2. – 380 с.

86. *Липницкий Т.М.* Гомеопатия: Основные проблемы. 2-е изд. – М., 1964. – 252 с.

87. *Розентул М.А.* Общая терапия болезней кожи. – М., 1956. – 442 с.

88. *Кокосов А.Н.* Разгрузочно-диетическая терапия: Руководство для врачей. – СПб., 2007. – 317 с.

89. *Федосеев Г. Б., Хлопотова Г.П.* Бронхиальная астма. – Л.: Медицина, 1988. – 268 с.

90. *Зимин А.Н.* Болезни уха, горла и носа. – Новосибирск: Изд. Гос. инст. усов. врачей, 1935. – 329 с.

91. *Случевский И.Ф.* В.М.Бехтерев – основоположник условнорефлекторной терапии // В кн. «В.М. Бехтерев и современная психоневрология». – Л., 1957. – 74 с.

92. *Карвасарский Б.Д.* Психотерапия. – М., Медицина, 1985. – 303 с.

93. *Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A.* Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium // Circulation. – 1986. – Vol. 74, № 5. – P. 1124–1136.

94. *Laude K., Beauchamp P., Thuillez C., Richard V.* Endothelial protective effects of preconditioning // Cardiovasc. Res. – 2002. – Vol. 55, № 3. – P. 466–473.

95. *Петрищев Н.Н., Цырлин В.А., Власов Т.Д. и др.* Комплексная оценка кардиопротективного действия феномена ишемической адаптации: влияние глубины ишемии на реализацию антиаритмического эффекта // Мед. акад. журнал. – 2001. – Т. 1, № 2. – С. 14–21.

96. *Zhao Z.Q., Corvera J.S., Halkos M.E. et al.* Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2003. – Vol. 285, № 2. – P. H579–H588.

97. *Heusch G.* Postconditioning: old wine in a new bottle? // J. Am. Coll. Cardiol. – 2004. – Vol. 44, № 5. – P. 1111–1112.

98. *Tsang A., Hausenloy D.J., Yellon D.M.* Myocardial postconditioning: reperfusion injury revisited // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2005. – Vol. 289. – P. 2–7.

99. *Staat P., Rioufol G., Piot C. et al.* Postconditioning the human heart // Circulation. – 2005. – Vol. 112. – P. 2143-2148.

100. *Kitagawa K., Matsumoto M., Tagaya M. et al.* «Ischemic tolerance» phenomenon found in the brain // Brain Res. – 1990. – Vol. 528. – P. 21–24.

101. *Zhao H., Sapolsky R.M., Steinberg G.K.* Interrupting reperfusion as a stroke therapy: ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rats // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2006. – Vol. 26, № 9. – P. 1114–1121.

102. *Barone F.C., White R.F., Spera P.A. et al.* Ischemic preconditioning and brain tolerance: temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression // Stroke. – 1998. – Vol. 29, № 9. – P. 1937–1950.

103. *Mallard C., Hagberg H.* Inflammation-induced preconditioning in the immature brain // Semin. Fetal Neonatal. Med. – 2007. – Vol. 12, № 4. – P. 280–286.

104. *Singhal A.B.* Oxygen therapy in stroke: past, present, and future // Int. J. Stroke. – 2006. – Vol. 1, № 4. – P. 191–200.

105. *van der Worp H.B., Macleod M.R., Kollmar R.* European Stroke Research Network for Hypothermia (EuroHYP). Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: ready to start large randomized trials? // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2010. – Vol. 30, № 6. – P. 1079–1093.

106. *Hatazaki S., Bellver-Estelles C., Jimenez-Mateos E.M. et al.* Microarray profile of seizure damage-refractory hippocampal CA3 in a mouse model of epileptic preconditioning // Neuroscience. – 2007. – Vol. 150, № 2. – P. 467–477.

107. *Matsushima K., Schmidt-Kastner R., Hogan M.J., Hakim A.M.* Cortical spreading depression activates trophic factor expression in neurons and astrocytes and protects against subsequent focal brain ischemia // Brain Res. – 1998. – Vol. 807, № 1–2. – P. 47–60.

108. *Rehni A.K., Singh T.G., Jaggi A.S., Singh N.* Pharmacological preconditioning of the brain: a possible interplay between opioid and calcitonin gene related peptide transduction systems // Pharmacol. Rep. – 2008. – Vol. 60, № 6. – P. 904–913.

109. *Zhao J., Sun S., Chen X.* Protective effects of focal ischemic preconditioning and HSP70 expression on middle cerebral artery occlusion in rats // J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci. – 2006. – Vol. 26, № 4. – P. 436–439.

110. *Nakamura M., Nakakimura K., Matsumoto M., Sakabe T.* Rapid tolerance to focal cerebral ischemia in rats is attenuated by adenosine A1 receptor antagonist // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2002. – Vol. 22, № 2. – P. 161–170.

111. *Ren C., Gao X., Niu G. et al.* Delayed postconditioning protects against focal ischemic brain injury in rats // PLoS One. – 2008. – Vol. 3, № 12. – P. e3851.

112. *Kin H., Zhao Z.Q., Sun H.Y. et al.* Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion // Cardiovasc. Res. – 2004. – Vol. 62, № 1. – P. 74–85.

113. *Noguchi C.T., Asavaritikrai P., Teng R., Jia Y.* Role of erythropoietin in the brain // Crit. Rev. Oncol. Hematol. – 2007. – Vol. 64, № 2. – P. 159–171.

114. *Carloni S., Girelli S., Buonocore G. et al.* Simvastatin acutely reduces ischemic brain damage in the immature rat via Akt and CREB activation // Exp. Neurol. – 2009. – Vol. 220, № 1. – P. 82–89.

115. *Li Y.S., Wang Z.X., Li C. et al.* Proteomics of ischemia/reperfusion injury in rat intestine with and without ischemic postconditioning // J Surg Res. – 2010. – Vol.164, № 1. – P. e173–e180.

116. *Oehmann C., Benz S., Drognitz O. et al.* Remote preconditioning reduces microcirculatory disorders in pancreatic ischemia/reperfusion injury // Pancreas. – 2007. – Vol. 35, № 4. – P. 45–50.

117. *Desai K.K., Dikdan G.S., Shareef A., Koneru B.* Ischemic preconditioning of the liver: a few perspectives from the bench to bedside translation // Liver Transpl. – 2008. – Vol. 14. – P. 1569–1577.

118. *Resch T.A., Acosta S., Sonesson B.* Endovascular techniques in acute arterial mesenteric ischemia // Semin. Vasc. Surg. – 2010. – Vol. 23, № 1. – P. 29–35.

119. *Takeda S., Hata R., Cao F. et al.* Ischemic tolerance in the cochlea // Neurosci. Lett. – 2009. – Vol. 462, № 3. – P. 263–266.

120. *Jacono A.A., Hu B., Kopke R.D. et al.* Changes in cochlear antioxidant enzyme activity after sound conditioning and noise exposure in the chinchilla // Hear Res. – 1998. – Vol. 117, № 1–2. – P. 31–38.

121. *Sha S.H., Schacht J.* Salicylate attenuates gentamicin-induced ototoxicity // Lab. Invest. – 1999. – Vol. 79, № 7. – P. 807–813.

122. *Li G., Sha S.H., Zotova E. et al.* Salicylate protects hearing and kidney function from cisplatin toxicity without compromising its oncolytic action // Lab. Invest. – 2002. – Vol. 82, № 5. – P. 585–596.

123. *Ding D., McFadden S.L., Browne R.W., Salvi R.J.* Late dosing with ethacrynic acid can reduce gentamicin concentration in perilymph and protect cochlear hair cells // Hear Res. – 2003. – Vol. 185, № 1–2. – P. 90–96.

124. *Minami S.B., Sha S.H., Schacht J.* Antioxidant protection in a new animal model of cisplatin-induced ototoxicity // Hear Res. – 2004. – Vol. 198, № 1–2. – P. 137–143.

125. *Theneshkumar S., Lorito G., Giordano P. et al.* Effect of noise conditioning on cisplatin-induced ototoxicity: a pilot study // Med Sci Monit. – 2009. – Vol. 15, № 7. – P. 173–177.

126. *Wu Z.K., Iivainen T., Pehkonen E. et al.* Ischemic preconditioning suppresses ventricular tachyarrhythmias after myocardial revascularization // Circulation. – 2002. – Vol. 106, № 24. – P. 3091–3096.

127. *Cheung M.M., Kharbanda R.K., Konstantinov I.E. et al.* Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans // J. Am. Coll. Cardiol. – 2006. – Vol. 47, № 11. – P. 2277–2282.

128. *Faries P.L., DeRubertis B., Trocciola S. et al.* Ischemic preconditioning during the use of the PercuSurge occlusion balloon for carotid angioplasty and stenting // Vascular. – 2008. – Vol. 16, № 1. – P. 1–9.

129. *Staat P., Rioufol G., Piot C. et al.* Postconditioning the human heart // Circulation. – 2005. – Vol. 112. – P. 2143–2148.

130. *Piot C., Croisille P., Staat P. et al.* Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction // N. Engl. J. Med. – 2008. – Vol. 359, № 5. – P. 473–481.

РОЛЬ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ТЕРАПИИ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СЕРДЦА

А.А. Карпов[1], Ю.К. Успенская[2], Д.Д. Ваулина[3]

[1] Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия
[2] Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия
[3] ФБГУН «Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой Российской академии наук (ИМЧ РАН)», Санкт-Петербург, Россия

Карпов Андрей Александрович – младший научный сотрудник НИЛ нанотехнологий Института экспериментальной медицины ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А Алмазова»; *Успенская Юлия Константиновна* – студентка 6 курса ГБОУ ВПО СПбГМУ им. И.П. Павлова Минздравсоцразвития России; *Ваулина Дария Дмитриевна* – младший научный сотрудник ФБГУН «Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой Российской академии наук (ИМЧ РАН)».

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. E-mail: a--karpoff@mail.ru (Карпов Андрей Александрович).

Резюме.

Инфаркт миокарда является одной из главенствующих проблем мирового здравоохранения и, несмотря на бурное развитие современной медицины, доступные на сегодня методы лечения этого заболевания ограничены в эффективности. Клеточная терапии миокарда – это абсолютно новый подход к терапии данного заболевания, направленный на восстановление поврежденной сердечной мышцы. Мезенхимные стволовые клетки (МСК) – это стволовые клетки, способные к самообновлению и многонаправленной дифференцировке. Первоначально выделенные из красного костного мозга, они также присутствуют в других тканях и органах. В исследованиях на модели инфаркта миокарда у животных была продемонстрирована способность МСК выживать и дифференцироваться в клетки сосудов и, возможно, даже в кардиомиоциты. Но наиболее важной особенностью трансплантированных МСК является секреция широкого спектра паракринных факторов, которые обеспечивают кардиопротективное действие и могут значимо способствовать восстановлению поврежденного миокарда. Однако, позитивные эффекты МСК у человека ограничены из-за низкой выживаемости этих клеток, что требует дальнейшего уточнения механизмов действия МСК и методов повышения их выживаемости.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, хроническая сердечная недостаточность, мезенхимные стволовые клетки, клеточная терапия.

THE ROLE THE MESENCHYMAL STEM CELLS IN THE TREATMENT OF ISCHEMIC CARDIAC INJURY

A.A. Karpov[1], Yu.K. Uspenskaya[2], D.D. Vaulina[3]

[1] Saint-Petersburg Pavlov State Medical University, Saint-Petersburg, Russia
[2] Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia
[3] N.P. Bekhtereva Institute of Human Brain, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: a--karpoff@mail.ru (Andrey A. Karpov – Junior Research Scientist, Scientific Research Laboratory of Nanotechnologies, Institute of Experimental Medicine).

Abstract.

Acute myocardial infarction represents one of the most important problems of world public health, and in spite of the rapid development of contemporary medicine, available treatments have limited efficacy. Cardiac cell therapy is a new therapeutic strategy focused on repair of the injured cardiac muscle. Mesenchymal stem cells (MSC) are stem cells with capacity for

self-renewal and multi-lineage differentiation. Initially described in the bone marrow, MSC are also present in other organs and tissues. Studies in animal models of myocardial infarction have demonstrated the ability of transplanted MSC to engraft and differentiate into vascular cells and perhaps even in cardiomyocytes. But the most important feature of the transplanted MSC secrete a wide array of soluble factors that mediate beneficial paracrine effects and may greatly contribute to cardiac repair. However, the beneficial effects of MSC in humans are limited due to poor survival of these cells, therefore ways to overcome these obstacles should improve efficacy which requires further refinement of protective mechanisms of MSC and methods to enhance their survival.

Key words: myocardial infarction, chronic heart failure, mesenchymal stem cells, cell therapy.

Статья поступила в редакцию 01.09.2012, принята к печати 15.09.2012.

Введение

Инфаркт миокарда (ИМ) и постинфарктная хроническая сердечная недостаточность (ХСН) являются одной из основных проблем мирового здравоохранения на сегодняшний день. Так, по данным Всемирной организации здравоохранения, ИМ останется главной причиной летальности до 2020 г. [1]. Несмотря на непрерывное совершенствование методов лечения ИМ и ХСН, повреждение миокарда является необратимым процессом, а возможности фармакологического и хирургического лечения лимитированы паллиативными эффектами. Большинство современных терапевтических подходов для лечения ХСН способны лишь задержать прогрессирование данного заболевания [2–4]. Таким образом, трансплантация сердца остается единственным эффективным подходом в лечении терминальных стадий сердечной недостаточности. Однако ограниченное число донорских органов не позволяет использовать данный вид терапии для лечения всех пациентов, которые нуждаются в трансплантации, что ограничивает применение этого метода [5].

При инфаркте миокарда, острая ишемия индуцирует некроз и апоптоз кардиомиоцитов [6], что в последующем приводит к заместительному фиброзу миокарда [7]. Этот процесс вносит вклад в ремоделирование левого желудочка, характеризующееся дилатацией, истончением стенки и нарушением сократительной функции левого желудочка, приводя в финале к ХСН.

Все это диктует необходимость разработки принципиально новых подходов к лечению ИМ, одним из которых является клеточная терапия [8]. Предполагается, что данная терапевтическая стратегия способна помочь в восстановлении поврежденной сердечной мышцы с целью предотвращения ремоделирования сердца и развития ХСН. В экспериментальных и/или клинических исследованиях было использовано множество различных типов стволовых клеток и клеток-предшественников из разных тканевых источников. Наиболее активно исследуемыми разновидностями стволовых клеток являются: эмбриональные стволовые клетки, мезенхимные стволовые клетки (МСК), гемопоэтические стволовые клетки/клетки-предшественники, неонатальные или фетальные стволовые клетки сердца, миобласты скелетной мускулатуры и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки [9–11].

Более того, некоторые из этих клеточных типов применялись в комбинации с различными модифицирующими методами для повышения их кардиопротективного эффекта, такими как тканевая инженерия, генетическая инженерия или прекондиционирование с использованием гипоксии или биологических факторов [12–14].

В данной обзорной статье внимание будет сфокусировано на МСК – одном из наиболее перспективных и исследуемых клеточных типов, используемых сейчас в терапии сердечно сосудистых заболеваний.

Свойства МСК

Первоначально строма красного костного мозга (ККМ) рассматривалась в основном как структурная основа для гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников [15]. А.Я. Фриденштейн в 70-х годах XX века впервые указал на наличие в строме ККМ клеток, обладающих свойствами стволовых клеток – МСК. На сегодняшний день известно, что строма ККМ – гетерогенная популяция, включающая фибробласты, МСК, адипоциты, эндотелиальные клетки и остеогенные клетки.

МСК – это мультипотентные стволовые клетки мезодермального происхождения, содержащиеся в ККМ в сравнительно малом количестве (1 : 100000 клеток красного костного мозга) [16]. Однако эти клетки могут быть выделены в первую очередь за счет их специфической адгезивной способности к пластиковым поверхностям.

Культуру МСК можно охарактеризовать, используя панель специфических антител. Тем не менее до сих пор нет единого мнения относительно специфических CD маркеров МСК, так как на фенотип этих клеток могут влиять такие факторы, как происхождение и условия культивирования (в частности, используемые питательные среды, различная плотность посева, а также напряжение кислорода) [17]. Достоверно установлено, что МСК характеризуются отсутствием экспрессии CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD79α или CD19 и HLA-DR поверхностных молекул, в тоже время экспрессией SH2 (CD105), SH3, SH4 (CD73), CD90, CD29 и CD166 (10102814, 16923606).

Как уже было указано, МСК являются мультипотентными стволовыми клетками, которые способны к дифференцировке в хондробласты, остеобласты, адипоциты, миоциты и эндотелиоциты [17]. В ряде исследований в условиях *in vitro* была показана способность МСК к направленной дифференцировке в кардиомиоциты [18], а также положительный эффект трансплантации МСК у пациентов с критической ишемией нижних конечностей [19].

На сегодняшний день основным источником получения этих клеток является ККМ, однако МСК присутству-

ют практически во всех тканях взрослого организма: жировой ткани [20], коже [21], пульпе зуба [22], печени [23], синовиальных оболочках [24], скелетной мышце [25], легком [26], пуповинной крови [27], амниотической жидкости [28] и плаценте [29]. Кроме того, источником МСК может служить периферическая кровь [30].

Специфические характеристики делают МСК интересными для клеточной терапии и целей тканевой инженерии. Например, МСК могут быть получены и культивированы с использованием аутологичных подходов, которые позволяют избежать проблемы поиска совместимого донора. Более того, существует ряд доказательств, что МСК не подвергаются аллогенному отторжению у животных и человека [16, 31]. Три основных механизма способствуют иммунопривилегированному профилю МСК. В первую очередь, МСК гипоиммуногенны, так как у них отсутствует экспрессия HLA II класса и ко-стимулирующих молекул. Во-вторых, было показано, что МСК косвенно предотвращают Т-клеточный ответ, как через модуляцию дендритных клеток, так и напрямую – через супрессию натуральных киллеров, а также функционирование CD8+ и CD4+ Т-клеток. В-третьих, МСК индуцирует супрессию локального микроокружения через продукцию простагландинов и интерлейкинов. Однако не все имеющиеся данные соответствуют таким оптимистическим взглядам, что требует дополнительных экспериментальных исследований на эту тему [32, 33]. Другой выгодной характеристикой МСК является их легкая способность к модификации вирусными векторами [34, 35]. С помощью гиперэкспрессии интересующих генов, функциональные возможности МКС могут быть увеличены. Например, МСК с гиперэкспрессией антиапоптических генов характеризуется большей устойчивостью к гипоксии в сравнении с немодифицированными МСК [36]. Более того, МСК могут быть использованы как платформа для выработки специфических растворимых белков в месте повреждения [37].

В ходе большого числа исследований применения МСК из ККМ (МСК-ККМ), проведенных как на человеке, так и на моделях ИМ у животных, был отмечен значимый позитивный эффект на исходы ИМ: уменьшение зоны инфаркта, ремоделирования камер сердца, а также усиление неоангиогенеза [38, 39]. Более того, введение МСК-ККМ в большинстве случаев улучшало функциональные возможности сердца. Обращает на себя внимание широкая вариабельность используемых экспериментальных протоколов, как по времени введения МСК (от нескольких минут после повреждения до 4 недель, когда острый воспалительный процесс прекращается), так и по способу введения стволовых клеток (прямое интрамиокардиальное введение, интракоронарное введение и системное внутривенное введение). Несмотря на значимые позитивные изменения в морфологии и функциональных возможностях поврежденного миокарда при использовании терапии МСК, на сегодняшний день не удалось выявить основной механизм действия стволовых клеток. Кроме того, неясна и последующая судьба трансплантированных клеток. На это указывает и тот факт, что хотя небольшое количество трансплантированных в сердце МСК экспрессируют мышечные, миокардиальные и/или эндокардиальные маркеры, такие как альфа-актин гладкомышечных клеток, десмин, тяжелые цепи β-миозина, сердечный тропонин Т [40, 41], было установлено, что этот процесс крайне незначителен и не способен объяснить весь объем кардиопротективного действия МСК в терапии ИМ [42]. Кроме того, благоприятное действие МСК появляется вскоре после трансплантации клеток (около 3 дней), что является недостаточным временем для дифференцировки стволовых клеток в миокардиальном направлении [42, 43].

На сегодняшний день существует несколько основных гипотез, объясняющих механизм действия МСК на сердце, подвергшееся ишемическому повреждению:

Выработка биологически активных веществ в зоне повреждения, регуляция метаболизма и стимуляция микроокружения;

Дифференцировка в эндотелиоциты и участие в неоангиогенезе;

Дифференцировка в кардиомиоциты сократительного миокарда.

Миграция МСК в зону ишемического повреждения

В течении первых 7 дней после инфаркта миокарда наблюдается острый воспалительный процесс [44], что сопровождается образованием в поврежденной ткани разнообразных медиаторов воспаления, цитокинов и факторов роста. Важнейшим компонентом воспаления является активация и миграция в поврежденный миокард различных типов лейкоцитов, что способствует процессу заживления [45]. Основными факторами, влияющими на миграцию лейкоцитов в очаг воспаления, являются интерлейкин-8 (ИЛ-8), ИЛ-10, моноцитарный хемотаксический фактор-1 (MCP-1), MIP-1α и MIP-1β, фактор роста гепатоцитов (HGF) и фактор стромальных клеток 1 (SDF-1) [46, 47]. Некоторые из активированных биологических факторов, такие как SDF-1 и HGF, также вовлечены в стимуляцию миграции МСК [48]. В свою очередь, МСК экспрессируют CXCR4 и c-Met, которые являются рецепторами для SDF-1 и HGF, соответственно. В эксперименте обработка МСК провоспалительными цитокинами увеличивала адгезию и восприимчивость этих клеток к миграции [49], указывая на способность МСК давать адаптивный ответ на воспалительные сигналы.

В начале процесса миграции в зону инфаркта, МСК сталкиваются с необходимостью преодоления эндотелиального барьера. В связи с этим на поверхности МСК был обнаружен ряд поверхностных молекул адгезии: VCAM-1, β-1 интегрин, VLA-4, ICAM-1, ICAM-3, CD44 и др. [50]. Более того, МСК секретируют матриксные металлопротеиназы, такие как MMP-2, которые также облегчают проникновение в инфарктную зону [51]. На основе анализа проведенных исследований можно сделать вывод, что секреция VCAM-1, VLA-4, β1 интегрина и MMP-2 играют ключевую роль в адгезии и эмиграции МСК [51, 52].

Одним из основных вопросов клеточной терапии, в т. ч. сердечно-сосудистых заболеваний, является выживание трансплантированных клеток в зоне повреждения. Не вызывает сомнений, что МСК способны сохранять жизнеспособность в миокарде реципиента после транс-

плантации, однако необходимо отметить, что процент выживших клеток в зоне ИМ довольно низок.

Основными причинами гибели МСК в зоне ИМ и периинфарктной области являются:

1) Гипоксия

2) Нарушение трофики в зоне трансплантации

3) Воздействие свободных радикалов и провоспалительных цитокинов

4) Иммуноопосредованное отторжение алло-/ксеногенных МСК

Наиболее обнадеживающие результаты при использовани алло-/ксеногенных МСК в эксперименте были получены при их трансплантации животным с иммунодефицитом, что предотвращало иммунное отторжение клеток [40]. Несмотря на относительную иммунопривилегированность МСК, было обнаружено отсутствие приживления спустя 7 дней после ксеногенной трансплантации у иммунокомпетентных крыс [53, 54]. В работе Muller-Ehmsen [55] оценивалась жизнеспособность мононуклеарных клеток костного мозга (МККМ) и МСК на модели ИМ у крыс в острейшей и подострой фазах. МККМ или МСК вводились в миокард непосредственно после начала ишемии или через 7 дней после ИМ. Это исследование показало, что спустя 6 недель после имплантации процент жизнеспособных клеток варьировал от 0,3 до 3,5% и не зависел от типа клеток и времени их введения.

Способность стволовых клеток сохранять жизнеспособность в миокарде тесно связана со способом их введения. Как интракоронарное, так и эндокардиальное введение МСК показали более высокую эффективность приживления в зоне инфаркта в сравнении с внутривенным введением. Данную особенность связывают с более высокой интенсивностью гибели трансплантированных клеток, а также с задержкой клеток в микроциркуляторном русле легких, печени и селезенки при внутривенном введении. Внутрикоронарное введение приводит к снижению скорости кровотока, в то время как эндокардиальное введение характеризуется схожим процентом выживаемости, но сравнительно более низким уровнем побочных эффектов [56]. Таким образом, вопрос о методах эффективной трансплантации стволовых клеток в зону ИМ до сих пор остается нерешенной проблемой и в этой связи методы, способствующие увеличению выживания клеток *in vivo*, несомненно, повысят эффективность клеточной терапии.

Дифференцировка МСК в кардиомиоциты

Способность к направленной дифференцировке МСК в клетки, фенотипически схожие с кардиомиоцитами, была показана в экспериментах *in vitro* с использованием 5-азацитидина. Так, в работе Makino сообщается об изменении морфологии почти 30% клеток с фибробластоподобной на палочкообразную форму, характерную для мышечных волокон, а также появлении маркеров на поверхности этих клеток, свойственных фетальным кардиомиоцитам. С помощью электронной микроскопии были выявлены саркомеры – структуры, являющиеся неотъемлемым элементом кардиомиоцитов. Важной находкой явилось обнаружение на поверхности клеток функционально компетентных М-холинорецепторов, а также α- и β-адренорецепторов [57].

Несмотря на вполне обнадеживающие данные, полученные *in vitro*, вопрос о способности МСК к направленной дифференцировке в кардиомиоциты в условиях ишемизированного миокарда *in vivo* до сих пор остается открытым [16, 42]. В ряде работ была показана способность незначительной части трансплантированных МСК экспрессировать тропонин Т и некоторые другие маркеры, характерные для кардиомиоцитов [58], что, впрочем, нельзя рассматривать как убедительные данные, свидетельствующие в пользу эффективной трансформации стволовых клеток в зрелые, функционально полноценные кардиомиоциты.

Роль МСК в процессах ангиогенеза

Ангиогенез является основной чертой растущей и сохранной ткани. В то же время, сниженная диффузия кислорода и нутриентов в ткани служит помехой для жизнедеятельности и функциональной активности любой клетки [59, 60]. В этой связи образование новых сосудов путем неоангиогенеза является неотъемлемым процессом для восстановления сердечной мышцы после ИМ; при этом в периинфарктной зоне формируются новые сосуды капиллярного типа, обеспечивающие кровоснабжение ишемизированного миокарда [58, 61].

В многочисленных экспериментальных работах, исследующих кардиопротективное действие МСК на миокард, перенесший ишемическое повреждение, было продемонстрировано значимое усиление ангиогенеза после проведения клеточной терапии [16, 62]. Однако механизм этого феномена остается не до конца понятным. В настоящее время наиболее перспективными теориями механизмов проангиогенного действия МСК являются:

1) Направленная дифференцировка МСК в эндотелиоциты и гладкомышечные клетки (ГМК) и встраивание последних во вновь образующиеся сосуды;

2) Паракринная стимуляция проангиогенными факторами микроокружения.

В условиях *in vitro* и *in vivo* была достоверно показана способность к дифференцировке зрелых МСК в эндотелиальные клетки и ГМК. Было установлено, что после 15 дней культивирования МСК начинают экспрессировать альфа-актин ГМК [63]. Более того, в условиях экспериментальной модели ИМ у крыс с помощью иммунофлуоресцентного исследования была продемонстрирована дифференцировка МСК в клетки с фенотипом, характерным для ГМК и эндотелиоцитов. При этом авторами работы отмечалось улучшение функциональной возможности сердца (увеличение сердечного выброса) и повышение плотности капиллярного русла в зоне инфаркта [64].

Несмотря на эти доказательства, некоторые исследователи считают, что МСК не дифференцируются в эндотелиальные клетки и ГМК, превращаясь в перициты, которые стабилизируют и способствуют созреванию новых сосудов [65].

Учитывая все приведенные выше данные, необходимо отметить, что в большинстве исследований на животных лишь ограниченное количество трансплантированных

МСК проявляли фенотипические признаки эндотелиоцитов и ГМК, что ставит под сомнение главенствующую роль прямой трансформации МСК в клетки сосудов в их проангиогенном действии.

Паракринное действие МСК

Существует все больше доказательств в пользу гипотезы, что паракринные факторы (цитокины и факторы роста (ФР)), секретируемые МСК, играют крайне важную роль в процессах репарации миокарда, перенесшего ишемическое повреждение [66]. Опосредованные МСК паракринные эффекты многообразны: цитокины и ФР стимулируют неоангиогенез, цитопротекцию, регенерацию миокарда. Более того, постинфарктное воспаление и процесс фиброза, сократимость миокарда и метаболизм сердечной мышцы могут также регулироваться паракринными факторами, секретируемыми МСК [66, 67].

МСК способны секретировать огромное разнообразие цитокинов и ФР, среди этих молекул наиболее важными являются: эндотелиальный фактор роста (VEGF), фактор роста фибробластов β (βFGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF-1), трансформирующий фактор роста β (TGFβ), ИЛ-6, HGF, ангиопоэтин-1 (Ang-1), SDF и тромбоцитарный фактор роста (PDGF) [68], гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) [69] (табл. 1)

В целом ряде работ главенствующее значение среди механизмов кардиопротективного действия МСК отводится именно секреции паракринных факторов [43, 70]. Действительно, несмотря на доказательства того, что МСК-КМ способны встраиваться в сосудистые структуры, некоторые исследования показывают, что лишь небольшое количество сосудов содержат клетки донора. Тем не менее, МСК-КМ приводят к значительному увеличению плотности капилляров и развитию коллатерального кровотока при их трансплантации в ишемизированную зону. Соответственно, было предложено, что возникающее проангиогенное и проартериогенное действие может быть опосредовано секрецией стволовыми клетками соответствующих цитокинов и ФР [71]. В экспериментах *in vitro* было показано ускорение ангиогенеза, миграции и улучшение выживаемости в культуре эндотелиальных клеток, кондиционированных вместе с МСК. Интрамиокардиальное введение среды, в которой производилось культивирование МСК, животным с ишемическим повреждением сердца, приводило к улучшению функциональных возможностей сердца, увеличению плотности капилляров и уменьшению размеров зоны ИМ [70]. Для МСК-КМ доказано прямое цитопротективное действие на ишемизированный миокард. В частности было показано снижение апоптоза и некроза в культуре кардиомиоцитов крысы в условиях гипоксии при воздействии на них среды, полученной при культивировании МСК в гипоксических условиях [72].

Кроме цитопротекции и стимуляции ангиогенеза паракринные факторы, секретируемые МСК, могут воздействовать на внеклеточный матрикс, что приводит к более благоприятному течению постинфарктного ремоделирования и укреплению рубца. Так, было показано снижение дилатации левого желудочка и увеличение толщины рубца у животных, перенесших ИМ после интрамиокардиального введения человеческих МСК [73].

Еще одним возможным механизмом паракринного действия МСК на поврежденный миокард является нормализация метаболизма сердечной мышцы, преимущественно периинфарктной области [74].

Кроме всего вышеперечисленного, кардиопротективное действие МСК может быть опосредовано через стимуляцию резидентных стволовых и/или прогениторных клеток сердца. Amado и соавт. [75] указывают на возможную связь паракринного действия МСК и активации резидентных стволовых клеток сердца в обеспечении регенерации миокарда за счет эндогенных стволовых клеток.

Заключение

Хотя терапия МСК, благодаря уникальным характеристикам этих клеток (биологическая доступность, безопасность и мультипотентность), является одним из наиболее перспективных направлений лечения сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), ее клиническое использование в настоящее время затрудняет ряд значительных биологических и технологических проблем. Наиболее важными вопросами остаются низкая выживаемость клеток после трансплантации и отсутствие четкого понимания главенствующих механизмов кардиопротективного действия стволовых клеток на ишемизированный

Таблица 1

Основные цитокины и ФР, секретируемые МСК

Цитокины/ФР	Основная функция
VEGF	Стимуляция и регуляция ангиогенеза и васкулогенеза
βFGF	Стимуляция пролиферации большого числа клеточных линий
IGF-1	Стимуляция пролиферации большого числа клеточных линий
SDF-1	Фактор хемотаксиса моноцитов, лимфоцитов, мегакариоцитов и гемопоэтических клеток
TGFβ	Регуляция клеточной пролиферации и дифференцировки
ИЛ-6	Медиатор воспаления
HGF	Стимуляция пролиферации и подвижности эпителиальных и эндотелиальных клеток
PDGF	Регуляция клеточной пролиферации и ангиогенеза
G-CSF	Стимуляция пролиферации и дифференцировки нейтрофилов
Ang-1	Стимуляция и регуляция ангиогенеза и васкулогенеза

VEGF – эндотелиальный фактор роста, βFGF – фактор роста фибробластов β, IGF – инсулиноподобный фактор роста, SDF – фактор стромальных клеток, TGFβ – трансформирующий фактор роста β , ИЛ-6 – интерлейкин 6, HGF – фактор роста гепатоцитов, PDGF – тромбоцитарный фактор роста, G – CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, Ang – 1 – ангиопоэтин-1.

миокард. Без решения этих проблем не представляется возможным дальнейшее раскрытие потенциала регенераторной терапии миокарда и перехода клеточной терапии ССЗ на принципиально новый клинический уровень. Однако уже сегодня, на основе многочисленных исследований можно с уверенность утверждать, что терапия МСК ССЗ является безопасной и способна существенно улучшать как морфологические, так и функциональные показатели сердца.

Кроме того, несомненный интерес вызывают и попытки модификации самих стволовых клеток с помощью генетических, биологических, а также физических воздействий. Это открывает перспективы контроля и модификации механизмов действия, повышения выживаемости клеток в условиях ишемии и создания принципиально новых кардиопротективных свойств МСК.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение 8489.

Литература

1. *Levi F., Lucchini F., Negri E. et al.* Trends in mortality from cardiovascular and cerebrovascular diseases in Europe and other areas of the world // Heart. – 2002. – Vol. 88, № 2. – P. 119–124.

2. *Bramucci E., Repetto A., Ferrario M. et al.* Effectiveness of adjunctive stent implantation following directional coronary atherectomy for treatment of left anterior descending ostial stenosis // Am. J. Cardiol. – 2002. – Vol. 90, № 10. – P. 1074–1078.

3. *McMurray J., Pfeffer M.* Heart failure // Lancet. – 2005. – Vol. 365, № 9474. – P. 1877-1889.

4. *Сонин Д.Л., Галагудза М.М., Сыренский А.В., Цырлин В.А.* Кардио- и вазопротекция в профилактике и лечении хронической сердечной недостаточности. Часть I // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2009. – Т. 8, № 4 (32). – С. 4–12.

5. *Costanzo M., Augustine S., Bourge R., Bristow M. et al.* Selection and treatment of candidates for heart transplantation. A statement for health professionals from the Committee on Heart Failure and Cardiac Transplantation of the Council on Clinical Cardiology, American Heart Association // Circulation. – 1995. – Vol. 92, № 12. – P. 3593–612.

6. *Kajstura J., Cheng W., Reiss K. et al.* Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats Lab // Invest. – 1996. – Vol. 74, № 1. – P. 86–107.

7. *Sun Y., Zhang J., Zhang J., Lamparter S.* Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats // J. Lab. Clin. Med. – 2000. – Vol. 135, № 4. – P. 316–323.

8. *Samper E., Diez-Juan A., Montero J. A., Sepúlveda P.* Cardiac Cell Therapy: Boosting Mesenchymal Stem Cells Effects // Stem. Cell Rev. – 2012. – Feb 16.

9. *Segers V.F., Lee R.T.* Stem-cell therapy for cardiac disease // Nature. – 2008. – Vol. 451, № 7181. – P. 937–942.

10. *Tongers J., Losordo D.W., Landmesser U.* Stem and progenitor cell-based therapy in ischaemic heart disease: promise, uncertainties, and challenges // Eur. Heart J. – 2011. – Vol. 32, № 10. – P. 1197–1206.

11. *Janssens S.* Stem cells in the treatment of heart disease // Annu. Rev. Med. – 2010. – Vol. 61. – P. 287–300.

12. *Martinez E.C., Kofidis T.* Adult stem cells for cardiac tissue engineering // J. Mol. Cell Cardiol. – 2011. – Vol. 50, № 2. – P. 312–319.

13. *Herrmann J.L., Abarbanell A.M., Weil B.R. et al.* Optimizing stem cell function for the treatment of ischemic heart disease // J. Surg. Res. – 2011. – Vol. 166, № 1. – P. 138–145.

14. *Haider H.Kh., Ashraf M.* Preconditioning and stem cell survival // J. Cardiovasc. Transl. Res. – 2010. – Vol. 3, № 2. – P. 89-102.

15. *Dexter T.M., Allen T.D., Lajtha L.G.* Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro // J. Cell Physiol. – 1977. – Vol. 91, № 3. – P. 335–344.

16. *Pittenger M.F., Martin B.J.* Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics // Circ. Res. – 2004. – Vol. 95, № 1. – P. 9–20.

17. *Gnecchi M., Danieli P., Cervio E.* Mesenchymal stem cell therapy for heart disease // Vascul. Pharmacol. – 2012. – Vol. 57, № 1. – P. 48–55.

18. *Xu W., Zhang X., Qian H, et al.* Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro // Exp. Biol. Med. (Maywood). – 2004. – Vol. 229, № 7. – P. 623–631.

19. *Седов В.М., Вавилов В.Н., Зарицкий А.Ю. и др.* Эффективность клеточной терапии у больных с критической ишемией нижних конечностей // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2011. – Т. 10, № 2. – С. 45–52.

20. *Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H, et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies // Tissue. Eng. – 2001. – Vol. 7, № 2. – P. 211–228.

21. *Toma JG., Akhavan M., Fernandes KJ, et al.* Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin // Nat. Cell Biol. – 2001. – Vol. 3, № 9. – P. 778–784.

22. *Gronthos S., Mankani M., Brahim J. et al.* Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo // Proc Natl Acad Sci U. S. A. – 2000. – Vol. 97, № 25. – P. 13625–13630.

23. *Najimi M., Khuu D.N., Lysy P.A, et al.* Adult-derived human liver mesenchymal-like cells as a potential progenitor reservoir of hepatocytes? // Cell Transplant. – 2007. – Vol. 16, № 7. – P. 717–728.

24. *De Bari C., Dell'Accio F., Tylzanowski P., Luyten F.P.* Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane // Arthritis. Rheum. – 2001. – Vol. 44, № 8. – P. 1928–1942.

25. *Williams J.T., Southerland S.S., Souza J. et al.* Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes // Am. Surg. – 1999. – Vol. 65, № 1. – P. 22-26.

26. *Lama VN., Smith L., Badri L., Thannickal V.J. et. al.* Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts // J. Clin. Invest. – 2007. – Vol. 117, № 4. – P. 989–996.

27. *Erices A., Conget P., Minguell J.J.* Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood // Br. J. Haematol. – 2000. – Vol. 109, № 1. – P.235–242.

28. *In 't Anker P.S., Scherjon S.A., Kleijburg-van der Keur C. et al.* Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation // Blood. – 2003. – Vol. 102, № 4. – P. 1548–1549.

29. *In 't Anker P.S., Scherjon S.A., Kleijburg-van der Keur C. et al.* Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta // Stem. Cells. – 2004. – Vol. 22, № 7. – P. 1338–1345.

30. *Kuznetsov S.A., Mankani M.H., Gronthos S. et al.* Circulating skeletal stem cells // J. Cell Biol. – 2001. – Vol. 153, № 5. – P. 1133–1140.

31. *Ryan J.M., Barry F.P., Murphy J.M., Mahon B.P.* Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection // J. Inflamm (Lond). – 2005. – Vol. Jul 26. – P. 2:8.

32. *Nauta A.J., Westerhuis G., Kruisselbrink A.B. et al.* Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting // Blood. – 2006. – Vol. 108, № 6. – P. 2114-2120.

33. *Eliopoulos N., Stagg J., Lejeune L, et al.* Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice // Blood. – 2005. – Vol. 106, № 13. – P. 4057–4065.

34. *Melo L.G., Pachori A.S., Gnecchi M., Dzau V.J.* Genetic therapies for cardiovascular diseases // Trends Mol Med. – 2005. – Vol. 11, № 5. – P. 240-250.

35. *Dzau V.J., Gnecchi M., Pachori A.S.* Enhancing stem cell therapy through genetic modification // J. Am .Coll. Cardiol. – 2005. – Vol. 46, № 7. – P. 1351–1353.

36. *Mangi A.A., Noiseux N., Kong D., et al.* Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts // Nat. Med. – 2003. – Vol. 9, № 9. – P. 1195–1201.

37. *Matsumoto R., Omura T., Yoshiyama M. et al.* Vascular endothelial growth factor-expressing mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2005. – Vol. 25, № 6. – P. 1168–1173.

38. *Williams A.R., Hare J.M.* Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease // Circ. Res. – 2011. – Vol. 109, № 8. – P. 923–940.

39. *Melo L.G., Pachori A.S., Kong D. et al.* Molecular and cell-based therapies for protection, rescue, and repair of ischemic myocardium: reasons for cautious optimism // Circulation. – 2004. – Vol. 109, № 20. – P. 2386–2393.

40. *Toma C., Pittenger M.F., Cahill K.S. et al.* Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart // Circulation. – 2002. – Vol. 105, № 1. – P. 93–98.

41. *Jiang W., Ma A., Wang T. et al.* Homing and differentiation of mesenchymal stem cells delivered intravenously to ischemic myocardium in vivo: a time-series study // Pflugers. Arch. – 2006. – Vol. 453, № 1. – P. 43–52.

42. *Noiseux N., Gnecchi M., Lopez-Ilasaca M. et al.* Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation // Mol Ther. – 2006. – Vol. 14, № 6. – P. 840–850.

43. *Gnecchi M., He H., Noiseux N. et al.* Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement // FASEB J. – 2006. – Vol. 20, № 6. – P. 661–669.

44. *Frangogiannis N.G., Smith C.W., Entman M.L.* The inflammatory response in myocardial infarction // Cardiovasc. Res. – 2002. – Vol. 53, № 1. – P. 31–47.

45. *Arslan F., de Kleijn D.P., Pasterkamp G.* Innate immune signaling in cardiac ischemi // Nat. Rev. Cardiol. – 2011. – Vol. 8, № 5. – P. 292–300.

46. *Nian M., Lee P., Khaper N., Liu P.* Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling // Circ. Res. – 2004. – Vol. 94, № 12. – P. 1543–1553.

47. *Nah D.Y., Rhee M.Y.* The inflammatory response and cardiac repair after myocardial infarction // Korean Circ. J. – 2009. – Vol. 39, № 10. – P. 393–398.

48. *Neuss S., Becher E., Wöltje M. et al.* Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing // Stem. Cells. – 2004. – Vol. 22, № 3. – P. 405–414.

49. *Kim YS., Park HJ., Hong MH. et al.* TNF-alpha enhances engraftment of mesenchymal stem cells into infarcted myocardium // Front Biosci. – 2009. – Vol. 14. – P. 2845–2856.

50. *Majumdar M.K., Keane-Moore M., Buyaner D. et al.* Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells // J. Biomed. Sci. – 2003. – Vol. 10, № 2. – P. 228–241.

51. *Steingen C., Brenig F., Baumgartner L. et al.* Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells // J. Mol. Cell Cardiol. – 2008. – Vol. 44, № 6. – P. 1072-1084.

52. *Segers V.F., Van Riet I., Andries L.J. et al.* Mesenchymal stem cell adhesion to cardiac microvascular endothelium: activators and mechanisms // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2006. – Vol. 290, № 4. – P. H1370–H1377.

53. *Grinnemo K.H., Månsson A., Dellgren G. et al.* Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 2004. – Vol. 127, № 5. – P. 1293–1300.

54. *Terrovitis J., Stuber M., Youssef A. et al.* Magnetic resonance imaging overestimates ferumoxide-labeled stem cell survival after transplantation in the heart // Circulation. – 2008. – Vol. 117, № 12. – P. 1555–1562.

55. *Müller-Ehmsen J., Krausgrill B., Burst V. et al.* Effective engraftment but poor mid-term persistence of mononuclear and mesenchymal bone marrow cells in acute and chronic rat myocardial infarction // J. Mol. Cell Cardiol. – 2006. – Vol. 41, № 5. – P. 876–884.

56. *Freyman T., Polin G., Osman H. et al.* A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction // Eur. Heart J. – 2006. – Vol. 27, № 9. – P. 1114–1122.

57. *Hakuno D., Fukuda K., Makino S. et al.* Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors // Circulation. – 2002. – Vol. 105, № 3. – P. 380–386.

58. *Tang J., Xie Q., Pan G. et al.* Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion // Eur. J. Cardiothorac. Surg. – 2006. – Vol. 30, № 2. – P. 353–361.

59. *Carmeliet P., Jain R.K.* Angiogenesis in cancer and other diseases // Nature. – 2000. – Vol. 407, № 6801. – P. 249–257.

60. *Zandonella C.* Tissue engineering: The beat goes on // Nature. – 2003. – Vol. 421, № 6926. – P. 884–886.

61. *Chen J.J., Zhou S.H.* Mesenchymal stem cells overexpressing MiR-126 enhance ischemic angiogenesis via the AKT/ERK-related pathway // Cardiol. J. – 2011. – Vol. 18, № 6. – P. 675–681.

62. *Armiñán A., Gandía C., García-Verdugo J.M. et al.* Mesenchymal stem cells provide better results than hematopoietic precursors for the treatment of myocardial infarction // J. Am. Coll Cardiol. – 2010. – Vol. 55, № 20. – P. 2244–2253.

63. *Davani S., Marandin A., Mersin N. et al.* Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model // Circulation. – 2003. – Vol. 108, Suppl. 1. – P. II253–II258.

64. *Psaltis P.J., Zannettino A.C., Worthley S.G., Gronthos S.* Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair // Stem. Cells. – 2008. – Vol. 26, № 9. – P. 2201–2210.

65. *Loffredo F., Lee R.T.* Therapeutic vasculogenesis: it takes two // Circ. Res. – 2008. – Vol. 103, № 2. – P. 128–130.

66. *Gnecchi M., Zhang Z., Ni A., Dzau V.J.* Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy // Circ. Res. – 2008. – Vol. 103, № 11. – P. 1204–1219.

67. *Mirotsou M., Jayawardena T.M., Schmeckpeper J. et al.* Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart // J Mol Cell Cardiol. – 2011. – Vol. 50, № 2. – P. 280–289.

68. *Uemura R., Xu M., Ahmad N., Ashraf M.* Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling // Circ. Res. – 2006. – Vol. 98, № 11. – P. 1414–1421.

69. *Haynesworth S.E., Baber M.A., Caplan A.I.* Cytokine expression by humanmarrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha // J. Cell Physiol. – 1996. – Vol. 166, № 3. – P. 585–592.

70. *Iso Y., Spees J.L., Serrano C. et al.* Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction

in mice without long-term engraftment // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2007. – Vol. 354, № 3. – P. 700–706.

71. *Kinnaird T., Stabile E., Burnett M.S. et al.* Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms // Circulation. – 2004. – Vol. 109, № 12. – P. 1543–1549.

72. *Gnecchi M., He H., Liang O.D. et al.* Paracrine action accounts for marked protection oischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells // Nat. Med. – 2005. – Vol. 11, № 4. – P. 367–368.

73. *Berry M.F., Engler A.J., Woo Y.J. et al.* Mesenchymal stem cell injection aftermyocardial infarction improves myocardial compliance // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2006. – Vol. 290, № 6. – P. H2196–H2203.

74. *Feygin J., Mansoor A., Eckman P. et al.* Functional and bioenergeticmodulations in the infarct border zone following autologous mesenchymal stem cell transplantation // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2007. – Vol. 293, № 3. – P. 1772–1780.

75. *Amado L.C., Saliaris A.P., Schuleri K.H. et al.* Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2005. – Vol. 102, № 32. – P. 11474–11479.

НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ N-ФЕНИЛАЛКИЛЬНОГО ПРОИЗВОДНОГО ТАУРИНА ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ У КРЫС

В.В. Бульон, Е.Н. Селина, И.Б. Крылова, Н.С.Сапронов

ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Бульон Валентина Валентиновна – старший научный сотрудник, кандидат биологических наук; *Селина Елена Николаевна* – младший научный сотрудник; *Крылова Ирина Борисовна* – старший научный сотрудник, кандидат биологических наук; *Сапронов Николай Сергеевич* – главный научный сотрудник, доктор медицинских наук, член-корреспондент РАМН.

Контактная информация: ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, отдел нейрофармакологии, ул. Академика Павлова, 12, Санкт-Петербург, Россия, 197376. E-mail: irinakrylova@mail.ru (Крылова Ирина Борисовна).

Резюме.

В опытах на крысах на моделях острой и хронической ишемии головного мозга установлен нейропротекторный эффект N-фенилалкильного производного нейроактивной сульфоаминокислоты таурин (ИЭМ-1715). Показано, что при острой ишемии мозга данное производное нормализовало энергетический обмен, снижало интенсивность ПОЛ и восстанавливало активность ферментов антиоксидантной системы. В условиях хронической ишемии мозга ИЭМ-1715 ограничивал или устранял нарушения когнитивных функций головного мозга. Это вещество повышало двигательную и исследовательскую активность, улучшало эмоциональное поведение и предупреждало амнезию навыка УРПИ.

Ключевые слова: острая и хроническая ишемия мозга, энергетический обмен, ПОЛ, антиоксидантная система, когнитивные функции, ИЭМ-1715.

NEUROPROSPECTIVE EFFECTS OF N-PHENYLALKYL DERIVATIVE OF TAURINE IN RAT CEREBRAL ISCHEMIA

V.V. Bulion, E.N. Selina, I.B. Krylova, N.S. Sapronov

Research Institute of Experimental Medicine of the Russian Academy of Medical Sciences, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Research Institute of Experimental Medicine of the Russian Academy of Medical Sciences, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: irinakrylova@mail.ru (Irina B. Krylova – PhD, Senior Research Scientist, Department of Neuropharmacology).

Abstact.

Neuroprotective effects of N-phenylalkyl derivate of taurine – neuroactive sulpho amino acid – (IEM-1715) was established on the models of the acute and chronic rat brain ischemia. It was shown, that in acute cerebral ischemia this derivative normalized energy metabolism, reduced intensity of the lipid peroxidation and restored enzyme activity of antioxidant system. Under conditions of chronic brain ischemia IEM-1715 limited or eliminated cognitive impairment of brain. This substance rose locomotor and research activity, improved emotional behaviour and prevented an amnesia of experience of conditioned reflex of passive avoidance.

Key words: acute and chronic brain ischemia, energy metabolism, lipid peroxidation, antioxidant system, cognitive function, IEM-1715.

Статья поступила в редакцию 01.08.2012, принята к печати 15.08.2012.

Поиск новых нейропротекторных средств, повышающих жизнеспособность нервной ткани в условиях кислородной недостаточности, является одной из наиболее важных задач современной фармакологии. Актуальность этой проблемы определяется тем, что не все имеющиеся в настоящее время препараты, прошедшие мультифокальные исследования в клинике, оказались достаточно эффективными. Некоторые из них такие, как антагонисты глутаматных рецепторов, не только не оказывают нейропртекторных эффектов, но и приводят к психическим осложнениям [1].

В отделе нейрофармакологии НИИЭМ СЗО РАМН синтезировано оригинальное соединений, представляющее N-фенилалкильное производное нейроактивной

сульфоаминокислоты таурина (ИЭМ-1715). Экспериментальные исследования показали, что это вещество проявляет выраженные антигипоксические и антиоксидантные свойства. Антигипоксические эффекты ИЭМ-1715, не уступающие эффектам гутимина и амтизола, были выявлены на моделях гипобарической гипоксической гипоксии, гипоксической гипоксии с гиперкапнией, гемической гипоксии и гистотоксической гипоксии [2, 3]. Антиоксидантное действие данного соединения установлено при экспериментальном токсическом поражении печени, в патогенезе которого ведущая роль принадлежит свободным радикалам, образующимся в результате метаболизма ксенобиотиов, и при ишемии миокарда [4, 5]. Морфологические исследования показали, что ИЭМ-1715 оказывает защитное действие, как на гепатоциты, так и на кардиомиоциты, снижая степень их повреждения [4, 5].

Целью данной работы явилось изучение нейропротекторных эффектов ИЭМ-1715 при острой и хронической ишемии головного мозга.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 300 крысах самцах линии Вистар массой 180-200 г. Были выполнены две серии опытов. В первой серии изучали влияние ИЭМ-1715 на энергетический обмен, процессы ПОЛ и антиоксидантную систему в головном мозге при острой ишемии. С этой целью в больших полушариях мозга определяли содержание АТФ, пирувата, лактата, гидроперекисей липидов (ГПЛ), малонового диальдегида (МДА), восстановленного глутатиона (ВГ), а также активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы методами, использованными нами в предыдущих работах [6–8].

Циркуляторную ишемию мозга у животных воспроизводили перевязкой двух общих сонных артерий под легким эфирным наркозом. Все экспериментальные животные были поделены на 5 групп: 1 – интактные крысы; 2, 3 – животные с ишемией мозга длительностью 90 мин и 24 часа (контроль); 4, 5 – крысы с ишемией мозга длительностью 90 мин и 24 часа, получавшие ИЭМ-1715. Данное вещество в дозе 25 мг/кг вводили внутрибрюшинно через 30 мин после перевязки сонных артерий, а на следующие сутки два раза в день.

Во второй серии экспериментов изучали влияние ИЭМ-1715 на когнитивные функции мозга при его хронической ишемии. У всех интактных животных до проведения эксперимента оценивали поведение в тесте «открытое поле», вырабатывали условную реакцию пассивного избегания (УРПИ) и регистрировали ее воспроизведение через 24 часа после обучения [9]. Определяли латентный период (ЛП) перехода крыс из светлого отсека камеры в темный.

Хроническую ишемию мозга у животных воспроизводили полной перевязкой левой общей сонной артерии и ограничением кровотока по правой общей сонной артерии до 50% от исходного уровня под легким эфирным наркозом. Экспериментальных крыс делили на 9 групп: 1 – интактные животные; 2, 3, 4, 5 – крысы с ишемией мозга длительностью 3, 7, 14 и 21 сутки (контроль); 6, 7, 8, 9 – животные с ишемией мозга длительностью 3, 7, 14 и 21 сутки, получавшие ИЭМ-1715 (25 мг/кг, два раза в день). У крыс всех перечисленных групп оценивали поведение в тесте «открытое поле» и воспроизведение навыка УРПИ.

Статистическую обработку данных проводили стандартными методами с использованием t-критерия Стъюдента и дисперсионного анализа ANOVA. Использовали пакет статистических программ Statistica 6.

Результаты

Результаты исследования показали, что перевязка обеих общих сонных артерий приводила к изменениям энергетического обмена в головном мозге крыс (табл. 1). Так, в результате 90-минутной окклюзии снижалось содержание АТФ на 40%, пирувата на 42% и увеличивалось количество лактата на 161 % по сравнению с интактными животными. Коэффициент лактат/пируват увеличивался с 9,8 до 44,3. После 24-часовой перевязки сонных артерий изменения указанных показателей энергетического метаболизма были уже менее выраженными, по сравнению с 90-минутной окклюзией, но оставались заметными по сравнению с интактными животными. Содержание АТФ и пирувата снижалось на 28% и 31 % соответственно, а количество лактата увеличивалось на 56%. Коэффициент лактат/пируват составлял 22,2.

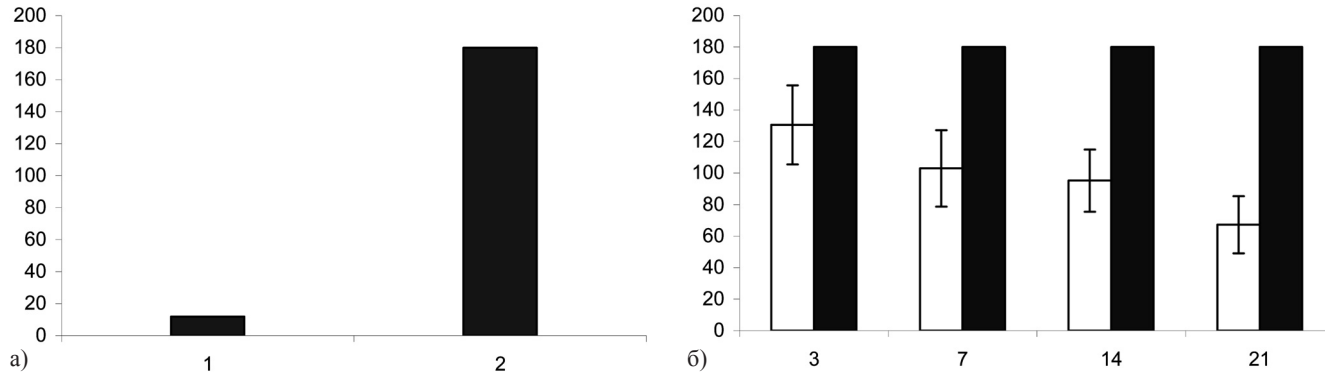


Рис.1. Влияние ИЭМ-1715 на воспроизведение навыка УРПИ у крыс с хронической ишемией мозга:
а – формирование и воспроизведение УРПИ у интактных крыс (1 – при обучении УРПИ, 2 – при тестировании УРПИ через 24 ч);.
б – динамика воспроизведения УРПИ у крыс с ишемией мозга, получавших ИЭМ-1715. Столбики – ЛП перехода животного в темную камеру: светлые – контроль, темные – ИЭМ-1715. По оси абсцисс – время, сутки.

Таблица 1

Влияние ИЭМ-1715 на показатели энергетического обмена в мозге крыс при острой церебральной ишемии (M ± m)

Группы животных	АТФ, мкмоль/г	Пируват,мкмоль/г	Лактат, мкмоль/г	Лактат/Пируват
Интактные	2,56 ± 0,09	0,26 ± 0,01	2,55 ± 0,06	9,8.
Ишемия 90 мин	1,54 ± 0,05#	0,15 ± 0,01#	6,65 ± 0,10#	44,3
Ишемия 24 час	1,84 ± 0,04#	0,18 ± 0,01#	3,99 ± 0,08#	22,2
Ишемия 90 мин + ИЭМ-1715	2,55 ± 0,08*	0,21 ± 0,01*	2,58 ± 0,07*	12,3
Ишемия 24 ч + ИЭМ-1715	2,65 ± 0,06*	0,25 ± 0,01*	2,36 ± 0,05*	9,4

Примечание: # – достоверность различий с группой интактных крыс, * – достоверность различий с соответствующим контролем при p < 0,001; в каждой группе по 10 животных.

Таблица 2

Влияние ИЭМ-1715 на показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы в мозге крыс при острой церебральной ишемии (M ± m)

Группы животных	ГПЛ $ОД_{480}$	МДА (нмоль/г)	СОД (А/мг белка)	Каталаза (мкмоль H_2O_2/ мин·мг белка)	ВГ (мкмоль/ г)
Интактные	0,097 ± 0,002	7,39 ± 0,13	3,48 ± 0,13	7,35 ± 0,12	37,56 ± 0,29
Ишемия 90 мин	0,133 ± 0,002#	9,98 ± 0,12#	2,57 ± 0,08#	5,73 ± 0,09#	28,77 ± 0,32#
Ишемия 24 ч	0,142 ± 0,002#	13,97 ± 0,38#	2,26 ± 0,07#	5,07 ± 0,08#	25,54 ± 0,31#
Ишемия 90 мин + ИЭМ-1715	0,102 ± 0,001*	7,48 ± 0,11*	3,57 ± 0,06*	7,28 ± 0,12*	37,44 ± 0,19*
Ишемии 24 ч + ИЭМ-1715	0,085 ± 0,002#*	7,30 ± 0,09*	3,49 ± 0,10*	7,25 ± 0,08*	37,21 ± 0,25*

Примечание: # – достоверность различий с группой ложнооперированных крыс; * – достоверность различий с соответствующим контролем при p < 0,05; в каждой группе по 10 животных; ГПЛ – гидроперекиси липидов; МДА – малоновый диальдегид; СОД – супероксиддисмутаза; ВГ – восстановленный глутатион.

Перевязка сонных артерий приводила также к изменениям в процессах ПОЛ и антиоксидантной системе (АОС) головного мозга (табл. 2). Так, через 90 мин после окклюзии содержание ГПЛ увеличивалось на 37%, а МДА на 35%. Одновременно снижались активность СОД на 26% и каталазы на 22%, а содержание ВГ – на 24%. Через 24 часа после перевязки сонных артерий наблюдалось еще большее накопление продуктов ПОЛ и снижение активности ферментов АОС. Содержание ГПЛ и МДА увеличивалось на 46% и 89% соответственно. При этом активность СОД снижалась на 35%, каталазы на 31%, а количество ВГ уменьшалось на 32%.

ИЭМ-1715 оказывал положительное влияние на энергетический обмен головного мозга крыс с острым нарушением церебрального кровообращения (табл. 1).Так, после применения данного вещества через 1,5 и 24 часа после окклюзии сонных артерий содержание АТФ, пирувата и лактата в ткани мозга достоверно не отличалось от нормы. Коэффициент лактат/пируват сохранялся на уровне такового у интактных животных и составлял 9,4.

Наряду с этим ИЭМ-1715 способствовал уменьшению продукции ГПЛ и МДА, а также увеличению активности СОД, каталазы и содержания ВГ в головном мозге после перевязки сонных артерий у крыс (табл. 2). Значения перечисленных показателей метаболизма у животных, получавших препарат на фоне 90-минутной и 24-часовой ишемии, были на уровне таковых у интактных животных.

Результаты исследования поведения крыс с хронической ишемией мозга в тесте «открытое поле» представлены в табл. 3. Из таблицы видно, что к 21-м суткам наблюдения у крыс снижалось количество горизонтальных перемещений на 66%, а количество вставаний на 85% по сравнению с этими показателями у интактных животных. Наиболее выраженное снижение горизонтальной и вертикальной двигательной активности приходились на 7-е сутки ишемии (на 82% и 91,5% соответственно).

Также отмечались изменения в эмоциональном поведении и исследовательской активности животных. На 21-е сутки ишемии показатели эмоциональности груминг и дефекация уменьшались на 64% и 13%, соответственно. Максимальное снижение груминга наблюдалось на 7-е сутки ишемии (на 73%), а количество дефекаций – на 3-и сутки (на 87%). Исследовательская активность животных к 3-м суткам ишемии была снижена на 40%, а в последующие сутки (7, 14 и 21) – на 83%, 77% и 80% соответственно.

У животных с хронической ишемией мозга отмечалась амнезия навыка УРПИ во все сроки наблюдения. Так на 3-й день ишемии ЛП перехода крыс в темную камеру составлял 130,6 ± 25,1 с (p < 0,05), на 7-й день 102,9 ± 24,2 с (p < 0,05), на 14-й 95,2 ± 19,7 с (p < 0,05), а на 21-й день (67,3 ± 18,1 с (p < 0,05) против 180 с у интактных животных.

ИЭМ-1715 оказывал корригирующее действие на все поведенческие реакции животных. Так к 21-м суткам терапии горизонтальная и вертикальная двигательная активность увеличивалась на 65% и 121% соответственно по сравнению с этими показателями у контрольных

Таблица 3

Влияние ИЭМ-1715 на поведение крыс с хронической ишемией мозга в тесте «открытое поле» в течение 180 секунд

Группы животных	Двигательная активность		Исследова-тельская активность(норка)	Эмоциональность	
	Перемещение	Вставание		Груминг	Дефекация
Интактные	41,9 ± 1,2	12,9 ± 0,5	3,0 ± 0,3	3,3 ± 0,3	3,1 ± 0,4
Контроль (ишемия) 3 сутки	19,4 ± 5,4#	4,4 ± 1,5#	1,8 ± 1,6	2,0 ± 0,5	0,4 ± 0,2#
Контроль 7 сутки	7,6 ± 2,1#	1,1 ± 0,4#	0,5 ± 0,2#	0,9 ± 0,4#	3,1 ± 0,8
Контроль 14 сутки	13,4 ± 3,2#	1,7 ± 0,5#	0,7 ± 0,2#	1,3 ± 0,5#	2,0 ± 0,6
Контроль 21 сутки	14,1 ± 1,9#	1,9 ± 0,6#	0,9 ± 0,4#	1,2 ± 0,4#	2,7 ± 0,6
Ишемия 3 сутки +ИЭМ-1715	13,5 ± 3,5#	2,5 ± 0,5#	0,6 ± 0,3#	1,6 ± 0,4#	1,5 ± 0,8
Ишемия 7 сутки +ИЭМ-1715	15,0 ± 2,8#*	2,6 ± 1,0#	0,7 ± 0,4#	1,1 ± 0,3#	2,3 ± 0,6
Ишемия 14 сутки +ИЭМ-1715	18,4 ± 2,5#	3,8 ± 0,5#*	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,3#	3,1 ± 0,8
Ишемия 21 сутки +ИЭМ-1715	23,2 ± 3,2#*	4,2 ± 0,5#*	1,9 ± 0,2*	1,5 ± 0,5#	3,1 ± 0,6

Примечание: # – достоверность различий с группой интактных крыс; * – достоверность различий с соответствующим контролем при $p < 0,05$.

крыс, а исследовательская активность – на 111 %. При этом показатели эмоциональности под влиянием препарата изменялись по-разному: груминг увеличивался на 25%, а дефекация восстанавливалась до нормы.

ИЭМ-1715 препятствовал развитию амнезии навыков УРПИ во все сроки ишемии: ЛП захождения крыс этих групп в темную камеру составлял 180 с.

Обсуждение

Основным патогенетическим звеном при кислородном голодании любой ткани, в том числе нервной, является недостаточность митохондриальной энергопродуцирующей сиситемы и прогрессирующий дефицит АТФ. Полагают, что именно энергетический дефицит является главной причиной гибели нейронов (некроза) в области инфаркта мозга (ядерной зоны ишемии) [10, 11].

Результаты проведенного нами исследования показали, что 90-минутная и 24-часовая окклюзия обеих общих сонных артерий крыс приводила к нарушениям энергетического обмена головного мозга, что проявлялось в снижении содержания АТФ и пирувата, а также в увеличении количества лактата. При этом максимальные изменения указанных показателей приходились на ранний период острый ишемии (90-минутная окклюзия). Соотношение лактат/пируват, возросшее на 90-минутном сроке ишемии с 9,8 до 44,3, свидетельствует о значительном превалировании анаэробного пути превращения углеводов. Известно, что переход тканей преимущественно на анаэробный гликолиз приводит к накоплению недоокисленных продуктов обмена, возникновению метаболического ацидоза и нарушению клеточного метаболизма [12, 13].

Энергодефицит, возникающий при недостатке кислорода в ткани, создает предпосылки для инициации ПОЛ, продукты которого обладают выраженным мембранноповреждающим действием [14, 15]. Как показали результаты наших исследований, 90-минутная и 24-часовая окклюзия сонных артерий приводила к накоплению ГПЛ и МДА, а также к снижению активности ферментов АОС СОД, каталазы и содержания ВГ в ткани мозга. Причем наиболее выраженные изменения приходились на 24-часовую ишемию. Падение активности СОД и каталазы, относящихся к первой линией антиоксидантной защиты, может препятствовать детоксикации потенциально опасных активных форм кислорода и способствовать увеличению скорости ПОЛ.

Наряду с уменьшением количества ВГ при циркуляторной ишемии мозга снижается активность глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и глутатионтрансферазы [16]. Эти факты свидетельствуют об ослаблении защитной функции глутатионовой системы, что может привести к активации свободнорадикального окисления липидов, деструкции мембран и гибели нейронов [17].

В условиях острой ишемии мозга ИЭМ-1715 оказывал стабилизирующее действие на энергетический обмен, препятствуя снижению содержания АТФ, пирувата и увеличению лактата уже в раннем периоде острой ишемии (90-минутная окклюзия). Способность ИЭМ-1715 устранять избыток лактата является важным свойством этого соединения, благодаря которому возможно предотвращение развития метаболического ацидоза, а, следовательно, повреждения и отека нервных клеток.

ИЭМ-1715 способствовал уменьшению образования ГПЛ и МДА, а также восстановлению активности ферментов АОС как при 90-минутной, так и 24-часовой ишемии мозга. Нормализация активности СОД и каталазы на ранних сроках ишемии свидетельствует о быстром включении данного вещества в процессы регуляции образования гидроксильных радикалов на стадии инициации ПОЛ, а увеличение содержания ВГ- о восстановлении защитной функции глутатионовой системы.

Известно, что одним из проявлений нарушения церебрального кровообращения является расстройство когнитивных функций мозга (внимание, память, способность к анализу ситуаций и принятию решений, пространственная ориентация) [10].

Результаты проведенного исследования показали, что у животных с хронической ишемией головного мозга наблюдались изменения в пространственной ориентации, эмоциональном поведении и исследовательской активности на протяжении всего срока наблюдения (21 сутки). Наиболее выраженные нарушения происходили в двигательной активности животных и менее выраженные – в эмоциональном и исследовательском поведении.

У животных с хронической ишемией мозга наблюдалось постепенное угасание навыка УРПИ. Так, к 3-м суткам наблюдения ЛП перехода контрольных крыс в темную камеру снижался на 27%, к 7-м суткам – на 43%, к 14-м суткам – на 47% и к 21-м суткам – на 63% по сравнению с интактными животными. Полученные данные свидетельствуют о нарушении процессов сохранения энграммы долговременной памяти и закрепления полученной информации в условиях хронической ишемии мозга.

Сравнительный анализ результатов, полученных при изучении поведенческих реакций в тесте «открытое поле « и воспроизведения навыка УРПИ, указывает на отсутствие корреляции между структурой целенаправленного поведения и ухудшением воспроизведения УРПИ. Этот факт свидетельствует о неоднозначном влиянии ишемии головного мозга на поведение и память.

ИЭМ-1715 оказывал положительное действие на все показатели поведения животных с хронической ишемией головного мозга в тесте «открытое поле». К 21-м суткам терапии это соединение улучшало двигательную и исследовательскую активность, а также эмоциональное поведение, но не восстанавливало их до исходного уровня.

ИЭМ-1715 препятствовал развитию амнезии УРПИ, о чем свидетельствует сохранение ЛП захождения крыс в темную камеру на всех сроках ишемии.

Сравнительный анализ результатов тестирования поведенческих реакций и воспроизведения навыка УРПИ у крыс с хронической ишемией мозга, получавших ИЭМ-1715, свидетельствует о дифференцированном влиянии данного вещества на сохранение УРПИ и поведенческие реакции в открытом поле. В связи с этим можно заключить, что положительный эффект ИЭМ-1715 на воспроизведение навыка УРПИ не связан с его действием на поведенческие реакции.

Согласно данным литературы, для восстановления нарушенной памяти используются не только ноотропные препараты с доминирующим мнестическим эффектом, но и средства с преимущественно метаболическим типом действия [18–20]. На основании полученных нами результатов в серии опытов с острой ишемией мозга можно полагать, что антиамнестический эффект ИЭМ-1715 обусловлен его активирующим влиянием на метаболические процессы.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали способность ИЭМ-1715 повышать устойчивость головного мозга к недостатку кислорода. Нейропротекторное действие данного вещества проявлялось на самых ранних сроках острой ишемии: нормализовался энергетический метаболизм, а также сохранялось равновесие между ПОЛ и АОС, необходимое для поддержания внутриклеточного гомеостаза. ИЭМ-1715 оказывал также антиамнестический эффект при хронической ишемии мозга.

Полученные данные позволяют считать ИЭМ-1715 перспективным средством для терапии острого нарушения мозгового кровообращения ишемического характера, а также хронической ишемии, сопровождающейся дефицитом когнитивных функций.

Литература

1. *Lyden P., Wahlgren N.G.* Mechanisms of action of neuroprotectants in stroke // J. Stroke Cerebrovasc. Dis. – 2000. – Vol. 9, № 6. – P. 9–14.

2. *Бульон В.В., Селина Е.Н., Крылова И.Б.* Антигипоксические эффекты N-фенилалкильного производного таурина // Мед. акад. журн. – 2009. – Т. 9, № 3. – С. 42–45.

3. *Gavrovskaya L.K., Krylova I.B., Selina E.N.* Antihypoxic properties of taurinamide derivatives: the experimental study. Advances experimental biology. Taurine 6. / Ed. S.S. Oja, P. Saransaari. Springer, 2005. – Vol. 583. – P. 523–528.

4. *Хныченко Л.К., Бульон В.В., Сапронов Н.С.* Изучение влияния производного таурина на некоторые показатели метаболизма при экспериментальном инфаркте миокарда // Экспер. и клин. фармакол. – 2001. – Т. 64, № 2. – С. 38–40.

5. *Хныченко Л.К., Бульон В.В., Сапронов Н.С., Кудряшова Н.И.* Исследование терапевтических свойств производного таурина при хронической патологии печени // Патол. физиол. и экспер. терапия – 2002. – № 1. – С. 6–8.

6. *Бульон В.В., Хныченко Л.К., Сапронов Н.С. и др.* Коррекция последствий постишемического реперфузионного повреждения головного мозга цитофлавином // Бюл. экспер. биол. И мед. – 2000. – Т. 129, № 2. – С. 149-152.

7. *Бульон В.В., Крылова И.Б., Родионова О.М. и др.* Сравнительное изучение кардиопротекторных эффектов уридин-5-монофосфата и уридин-5-трифосфата на ранних сроках острой ишемии миокарда // Бюл. экспер. биол. и мед. – 2007. – Т. 144, № 9. – С. 297–300.

8. *Крылова И.Б., Бульон В.В., Селина Е.Н. и др.* Влияние уридина на энергетический обмен, ПОЛ и антиоксидантную систему в миокарде в условиях острой коронарной недостаточности // Бюл. экспер. биол. и мед. – 2012. – Т. 153, № 5. – С. 596–599.

9. *Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж.П.* Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. – М: Высшая школа, 1991. – С. 135–240.

10. *Гусев Е.И., Скворцова В.И.* Ишемия головного мозга. – М.: Медицина, 2001.

11. *Niizuma K., Endo H., Chan P.* Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival // J. Neurochem. – 2009.- Vol. 109. P. – 133–138.

12. *Doyle K.P., Simon R.P.,Stenzel-Poore M.P.* Mechanisms of ischemic brain damage // Neuropharmacol. – 2008. – Vol. 55. – P. 310–318.

13. *Rehncrona S.* Brain acidosis // Ann. Emerg. Med. – 1985. – Vol. 14. – P. 770–776.

14. *Суслина З.А., Максимова М.Ю., Федорова Т.Н.* Оксидантный стресс и основные направления нейропотекции при нарушениях мозгового кровообращения // Неврол. журн. – 2007. – № 4. – С. 4–8.

15. *Румянцева С.А., Федин А.И., Сохова О.Н.* Антиоксидантная терапия ишемических поражений головного мозга. Приложение «Инсульт»// Журн. неврол. и психиат. – 2011. – Т. 111, № 4. – С. 28–31.

16. *Зарубина И.В., Шабанов П.Д.* Молекулярная фармакология антигипоксантов – СПб.:Н-Л, 2004. – С. 59–65.

17. *Бульон В.В., Крылова И.Б., Евдокимова Н.Р. и др.* Сравнительное изучение влияния цитофлавина и нейронола на морфологические изменения в головном мозге и выживаемость крыс с ишемическим нарушением мозгового кровообращения // Бюл. экспер. биол. И мед. – 2004. – Т. 137, № 4. С. 457–470.

18. *Бульон В.В., Федотова Ю.О., Коваленко А.Л. и др.* Антиамнестический эффект цитофлавина и нейронола при ишемическом нарушении мозгового кровообращения // Экспер. и клин. фармакол. – 2004. – Т. 67., № 5 – С. 5–8.

19. *ВоронинаТ.А., Середенин С.Б.* Ноотропные препараты, достижения и новые проблемы // Экспер. и клин. фармакол. – 1998. – Т. 61, № 4. – С. 3–9.

20. *Воронина Т.А.* Антиоксидант мексидол. Основные нейропсихотропные эффекты и механизмы действия // Психофармакол., биол., наркол. – 2001. – № 1. – С. 2–12.

РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ АТФ-ЗАВИСИМЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ В МЕХАНИЗМЕ АНТИИШЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ УРИДИНА И УМФ ПРИ ОСТРОЙ ИШЕМИИ МИОКАРДА

И.Б. Крылова[1], В.В. Бульон[1], Е.Н. Селина[1], О.М. Родионова[1], Н.С. Сапронов[1], Г.Д. Миронова[2]

[1] Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия
[2] Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

Крылова Ирина Борисовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник*; Бульон Валентина Валентиновна* – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник*; Селина Елена Николаевна* – младший научный сотрудник*; Родионова Ольга Михайловна* – кандидат биологических наук, научный сотрудник*; Сапронов Николай Сергеевич* – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАМН, главный научный сотрудник; *Миронова Галина Дмитриевна* – доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией.

Контактная информация: ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, отдел нейрофармакологии, ул. Академика Павлова, 12, Санкт-Петербург, Росиия, 197376. E-mail: irinakrylova@mail.ru (Крылова Ирина Борисовна).

Резюме.

Целью настоящего исследования было изучение антиишемического потенциала предшественников синтеза УДФ уридина и УМФ, установление связи их кардиопротекторного действия с активацией митоК$_{АТФ}$-каналов, а также исследование влияние уридина и УМФ на уровень УДФ в миокарде в норме и в условиях ишемии. Введение крысам уридина или УМФ за 5 мин до окклюзии левой коронарной артерии приводило к сокращению зоны ишемического повреждения миокарда, снижению амплитуды Т-волны на ЭКГ, восстановлению содержания АТФ и креатинфосфата на 60 мин острой ишемии миокарда. Селективный ингибитор митоК$_{АТФ}$-каналов 5-гидроксидеканоат препятствовал проявлению кардиопротекторного антиишемического действия уридина и УМФ. Это свидетельствует о том, что реализация защитного эффекта этих препаратов связана с активацией митоК$_{АТФ}$-каналов. Через 60 мин после внутривенного введения УМФ и уридина интактным крысам обнаружено увеличение содержания УДФ в миокарде в 1,3 и 2 раза соответственно по сравнению с фоновыми значениями. Введение УМФ за 5 мин до ишемии приводило к повышению уровня УДФ в миокарде в 1,9 по сравнению с интактными животными и в 1,4 раза по сравнению с контрольной группой. При введении уридина до окклюзии ЛКА наблюдалась тенденция к увеличению миокардиальной концентрации УДФ. Можно предположить, что уридин и УМФ, введенные в кровеносное русло, захватываются клетками миокарда и участвуют в синтезе УДФ, который является природным активатором митоК$_{АТФ}$-каналов.

Ключевые слова: острая ишемия миокарда, митоК$_{АТФ}$–канал, уридин, УМФ, УДФ.

THE ROLE OF MITOCHONDRIAL ATP -DEPENDENT POTASSIUM CHANNEL IN THE MECHANISM OF ANTI-ISCHEMIC EFFECT OF URIDINE AND UMP IN ACUTE MYOCARDIAL ISCHEMIA

I.B. Krylova[1], V.V. Bylion[1], E.N. Selina[1], O.M. Rodionova[1], N.S. Sapronov[1], G.D.Mironova[2]

[1]Institute of Experimental Medicine RAMS, Saint-Petersburg, Russia
[2]Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchin, Russia

Corresponding author: Institute of Experimental Medicine of the NorthWest Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, 12 Akad.Pavlov str., Saint-Petersburg, Russia, 197376. E-mail: irinakrylova@mail.ru (Irina B. Krylova – PhD, Senior Research Scientist, Department of Neuropharmacology).

Abstract.

The aim of this study was to investigate the anti-ischemic potential of uridine and UMP – the natural precursors of UDP synthesis, to establish the relationship between their cardioprotective properties and activation of mitoK$_{ATP}$- channels, and to study the effect of uridine and UMP on UDP level in the myocardium in normal and ischemic conditions. Uridine or UMP intravenous injection 5 min before left coronary artery (LCA) occlusion led to a reduction of area of ischemic myocardial injury decreased the amplitude of the T-wave on the ECG, increased ATP and creatine phosphate levels towards 60 minute of acute myocardial ischemia. Selective inhibitor of mitoK$_{ATP}$-channel 5-hydroksydecanoat prevented the appearance of

the anti-ischemic action of uridine and UMP. This indicates that the realization of the protective effect of these drugs is associated with activation of mitoK$_{ATP}$-channels. 60 min after intravenous administration of UMP and uridine intact rats showed an increase of UDP content in the myocardium 1,3 and 2 times, respectively, compared with the baseline values. Introduction of UMP 5 min before ischemia resulted in the increase of myocardial UDP 1.9 times as compared with intact animals and 1.4 times as compared to the control group. Introduction of uridine before LCA occlusion tended to increase myocardial concentration of UDP. We can assume that exogenous uridine and UMP may be captured by myocardial cells and are involved in the synthesis of UDP, which is a natural activator of mitoK$_{ATP}$-channels.

Key words: acute myocardial ischemia, mitoK$_{ATP}$-channel, uridine, UMP, UDP.

Статья поступила в редакцию 01.09.2012, принята к печати 15.09.2012.

Данные многочисленных исследований свидетельствуют о том, что митохондриальные АТФ-зависимые K^+ каналы (митоК$_{АТФ}$) играют ключевую роль в реализации эндогенного механизма защиты миокарда от повреждающего действия ишемии/реперфузии [1, 2]. Активность митоК$_{АТФ}$ регулируется сложной системой сигнальных путей и метаболических механизмов. К числу модуляторов каналов относятся аденозин, ацетилхолин, брадикинин, катехоламины, опиоиды, гормоны и другие соединения, которые выступают в роли триггеров и запускают каскад реакций, приводящий, в конечном счете, к активации митоК$_{АТФ}$ [3]. Прямая регуляция работы митоК$_{АТФ}$ осуществляется фосфонуклеотидами. АТФ является ингибитором канала, и снижение его концентрации при ишемии сопровождается активацией данного канала. Было показано, что дифосфонуклеотиды АДФ и ГДФ могут активировать канальную субъединицу [4, 5]. Нами был обнаружен еще один природный активатор митоК$_{АТФ}$ – уридин-5´-дифосфат (УДФ) [6]. Оказалось, что в ряду дифосфонуклеотидов он является наиболее эффективным и в микромолярных концентрациях (20 мкМ) полностью реактивирует заингибированную АТФ канальную субъединицу, реконструированную в бислойную липидную мембрану. В интактных митохондриях митоК$_{АТФ}$ реактивируется при тех же концентрациях УДФ, и этот эффект снимается неселективным и селективным игибиторами канала глибенкламидом и 5-гидроксидеканоатом (5-HD) [6]. Однако использование УДФ для создания условий фармакологической прекондиции в целях уменьшения ишемического и реперфузионного повреждения миокарда имеет серьезные ограничения. В опытах in vitro на изолированных сердцах крыс было показано, что он оказывает проаритмогенное действие при восстановлении коронарного кровотока после тотальной или регионарной ишемии [7]. Кроме того, УДФ является химически нестабильным соединением, что может затруднить его использование в терапевтических целях. В то же время, уридин и уридин-5’-монофосфат (УМФ), которые являются метаболическими предшественниками УДФ, могут, в отличие от последнего, проникать в клетку и участвовать в его синтезе [8]. Ранее нами было показано, что добавление в перфузируемый раствор уридина и УМФ препятствует депрессии сократительной функции ишемизированного миокарда изолированных сердец [9], предупреждает развитие миокардиального станнинга при постишемической реперфузии [10] и оказывает выраженный антиаритмический эффект [7]. Целью настоящего исследования было изучение антиишемического потенциала предшественников синтеза УДФ уридина и УМФ, установление связи их кардиопротекторного действия с активацией митоК$_{АТФ}$, а также исследование влияние уридина и УМФ на уровень УДФ в миокарде в норме и в условиях ишемии.

Материалы и методы

Исследование было выполнено на 132 крысах-самцах линии Вистар массой 250–300 г. Острую ишемию миокарда (ОИМ) моделировали по методу Селье. Животных наркотизировали этаминалом натрия (50 мг/кг). Все операционные вмешательства осуществляли при искусственной вентиляции легких (частота дыхания – 60, дыхательный объем – 2 мл/100 г массы тела). Проводили торакотомию и на 60 минут накладывали лигатуру на левую коронарную артерию (ЛКА) у нижнего края ушка левого предсердия. Животные были разделены на следующие группы: 1 – контроль –острая ишемия миокарда (ОИМ); 2 – ОИМ+5-HD; 3 – ОИМ+уридин; 4 – ОИМ+УМФ; 5 – ОИМ+уридин+5-HD; 6 – ОИМ+УМФ+5-HD; 7 – интактные животные. Уридин, УМФ и селективный ингибитор митоК$_{АТФ}$ 5-HD вводили в яремную вену. Препараты растворяли в 0,9% физиологическом растворе. Уридин и УМФ вводили в дозе 30 мг/кг за 5 мин до окклюзии. 5-HD (5 мг/кг) – за 10 мин до окклюзии. Доза и время введения ингибитора были выбраны на основании данных литературы, как оптимальные для оказания ингибирующего действия [11]. Запись ЭКГ осуществляли до окклюзии и на 3, 30 и 60 мин после окклюзии во II стандартном отведении. Для оценки степени ишемических нарушений измеряли амплитуду Т-волны.

Через 60 мин после окклюзии сердца крыс замораживали при –20 °С для морфометрического определения объема повреждения миокарда или в жидком азоте для биохимических исследований. Объем повреждения миокарда оценивали с помощью планиметрии серийных срезов желудочков сердца после гистохимического определения в них фермента гликоген-фосфорилазы. Индекс повреждения миокарда (ИПМ) рассчитывали по формуле: ИПМ = $\sum S_{1-4}$/лин. увел^2 х вес сердца, где S_{1-4} – сумма площадей зоны повреждения с потерей ферментативной активности [12]. В сердце определяли содержание АТФ и УДФ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [13] и креатинфосфата (КФ) [14].

Статистическую обработку данных проводили стандартными методами с использованием t-критерия Стъюдента и дисперсионного анализа ANOVA. Использовали пакет статистических программ Statistica 6.

Таблица 1

Изменение амплитуды Т-волны на ЭКГ крыс с острой ишемией миокарда под действием уридина и УМФ

Группа	Амплитуда Т-волны (мВ)			
	Исходная	После окклюзии ЛКА		
		3 мин	30 мин	60 мин
Контроль (ОИМ)	0,19 ± 0,01	0,54 ± 0,04	0,59 ± 0,02	0,55 ± 0,03
ОИМ + 5-HD	0,17 ± 0,02	0,63 ± 0,03	0,65 ± 0,04	0,59 ± 0,04
ОИМ + Уридин	0,18 ± 0,01	0,34 ± 0,03*	0,40 ± 0,02*	0,35 ± 0,03*
ОИМ + 5-HD + Уридин	0,20 ± 0,01	0,54 ± 0,00	0,58 ± 0,01	0,53 ± 0,04
ОИМ + УМФ	0,17 ± 0,02	0,41 ± 0,03*	0,38 ± 0,03*	0,34 ± 0,02*
ОИМ + 5-HD + УМФ	0,18 ± 0,01	0,67 ± 0,06	0,66 ± 0,03	0,64 ± 0,03

Примечание: ОИМ- острая ишемия миокарда, 5-HD – 5-гидроксидеканоат (селективный ингибитор митоК$_{АТФ}$). Уридин и УМФ вводили за 5 минут до окклюзии левой коронарной артерии (ЛКА) в дозе 30 мг/кг, –5-HD – за 5 минут до тестируемых препаратов в дозе 5 мг/кг. * – $p < 0,05$, по сравнению с контролем.

Результаты

Через 60 мин после окклюзии ЛКА наблюдались признаки ишемического повреждения миокарда, что выражалось в исчезновении активности гликоген-фосфорилазы в кардиомиоцитах. ИПМ составил 1,08 ± 0,04. Введение уридина за 5 мин до окклюзии привело к уменьшению объема повреждения в 2 раза (ИПМ = 0,59 ± 0,06), а УМФ – почти в 3,5 раза (ИПМ = 0,31 ± 0,07) (рис. 1). Ингибитор митоК$_{АТФ}$ 5-HD блокировал защитный эффект этих соединений, при этом сам не влиял на формирование зоны ишемии. Аналогичные изменения наблюдались и в отношении амплитуды Т-волны на ЭКГ, отражающей степень ишемических изменений в миокарде. У контрольных животных через 3 минуты после окклюзии амплитуда Т-волны в 3 раза превышала исходные значения и продолжала удерживаться на этом уровне до окончания срока наблюдения (табл. 1). Предварительное введение уридина и УМФ ограничивало увеличение амплитуды Т-волны. Положительный эффект препаратов полностью блокировался 5-HD.

ОИМ приводила к нарушению энергетического обмена в миокарде. Так содержание АТФ и КФ уменьшалось на 35% и 59% соответственно (рис. 2). Уридин и УМФ предотвращали возникновение дефицита этих макроэргических соединений. При ингибировании митоК$_{АТФ}$ 5-HD энергосберегающий эффект препаратов не проявлялся.

Через 60 мин после внутривенного введения уридина или УМФ интактным крысам в миокарде наблюдалось увеличение содержания УДФ (табл. 2). При этом эффект уридина носил более выраженный характер.

Таблица 2

Влияние уридина и УМФ на содержание УДФ в миокарде интактных крыс и через 60 мин после окклюзии левой коронарной артерии

Группы	Концентрация УДФ, нмоль/г ткани
Интактные	37,71 ± 2,59
Интактные + уридин	74,40 ± 9,25*
Интактные + УМФ	50,75 ± 8,84
ОИМ	49,14 ± 5,95
ОИМ + уридин	52,26 ± 15,34
ОИМ + УМФ	70,10 ± 13,10*

Примечание: ОИМ- острая ишемия миокарда.Уридин и УМФ вводили в/в в дозе 30 мг/кг. * – различия между интактной и экспериментальными группами статистически достоверно при $p < 0,05$

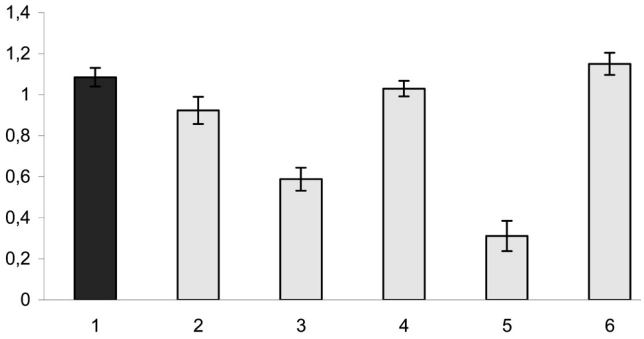


Рис. 1. Влияние уридина и УМФ на величину зоны ишемического повреждения через 60 мин после окклюзии левой коронарной артерии. Столбики – Индекс повреждения миокарда: 1 – контроль (ОИМ), 2 – 5-гидроксидеканоат (5-HD, селективный ингибитор митоК$_{АТФ}$), 3 – ОИМ + уридин, 4 – ОИМ + 5-HD + уридин, 5 – ОИМ + УМФ, 6 – ОИМ + 5-HD + УМФ

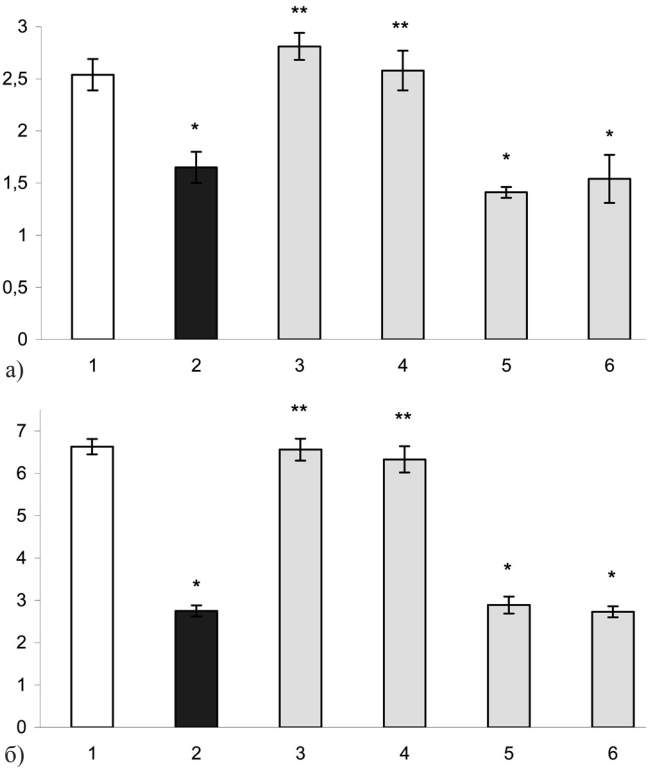


Рис. 2. Влияние ингибирования митоК$_{АТФ}$ на энергосберегающий эффект уридина и УМФ при острой ишемии миокарда: А – содержание АТФ (мкмоль/г) в миокарде, Б – содержание КФ (мкмоль/г) в миокарде, 1 – интактные, 2 – контроль – острая ишемия миокарда (ОИМ), 3 – ОИМ + уридин, 4 – ОИМ + 5-HD + уридин, 5 – ОИМ + УМФ, 6 – ОИМ + 5-HD + УМФ

У контрольных животных с ОИМ к 60 мин ишемии существенных изменений в содержании УДФ по сравнению с интактными крысами не обнаружено. Введение УМФ за 5 мин до окклюзии ЛКА приводило к повышению уровня УДФ в миокарде в 1,9 по сравнению с этим показателем у интактных животных и в 1,4 раза по сравнению с контрольной группой. При введении уридина наблюдалась лишь тенденция к увеличению концентрации УДФ.

Обсуждение

Активация митоК$_{АТФ}$ является природным механизмом защиты от гипоксии, который предупреждает и ограничивает развитие морфофукциональных нарушений, возникающих в результате ишемии и последующей реперфузии миокарда [3]. Проведенные нами ранее исследования на модели бислойной липидной мембраны показали возможность активации этих каналов различными нуклеотидами, среди которых наиболее эффективным оказался УДФ [5, 6]. Однако использование этого соединения как фармакологического агента осложняется его химической нестабильностью и неспособностью проникать в клетку. Поэтому для последующего изучения были выбраны его метаболические предшественники – уридин и УМФ.

Результаты проведенного исследования показали, что при введении уридина или УМФ за 5 мин до окклюзии проявлялся эффект фармакологической прекондиции, который заключался в ограничении зоны повреждения кардиомиоцитов и стабилизации энергетического обмена. Известно, что в очагах ишемии активность гликогенфосфорилазы, в отличие от тетразолий-чувствительных дегидрогеназ, очень быстро снижается [15]. Это дает возможность визуализировать зоны поврежденной ткани на ранних сроках экспериментального острого инфаркта миокарда [12]. Использование этого метода позволило установить, что как уридин, так и УМФ снижают ИПМ через 60 мин после окклюзии ЛКА. Электрофизиологическим подтверждением этого факта служил характер изменения амплитуды Т-волны на ЭКГ. Предварительное введение 5-HD блокировало эффект препаратов.

Как известно, основным патогенетическим звеном ишемического повреждения кардиомиоцитов является возникновение дефицита макроэргических соединений [16]. По данным литературы активация митоК$_{АТФ}$ приводит к сохранению функциональной активности митохондрий и поддержанию синтеза АТФ в ишемизированном миокарде [11, 17, 18]. Полагают, что это способствует увеличению резистентности миокарда к недостатку кислорода.

Результаты нашего исследования показали, что через 60 мин после окклюзии ЛКА в миокарде крыс наблюдалось значительное уменьшение концентрации АТФ и КФ. Следует отметить, что снижение содержания КФ было более выраженным по сравнению с АТФ. Возможно, это связано с тем, что имеющийся на ранних стадиях острой ишемии запас КФ используется для внутриклеточного транспорта энергии и поддерживает, таким образом, локальные клеточные пулы АТФ, в то время как пул самого КФ в условиях гипоксии не пополняется.

Введение животным уридина или УМФ за 5 мин до окклюзии приводило к стабилизации энергетического обмена в ишемизированном миокарде, что проявлялось в восстановлении концентрации АТФ и КФ до исходного уровня. Селективный блокатор митоК$_{АТФ}$ 5-HD, введенный животным за 5 мин до уридина или УМФ, устранял их энергостабилизирующее действие. Содержание АТФ и КФ в миокарде крыс этой группы оставалось на уровне значений этих показателей у контрольных животных. Этот факт позволяет говорить о том, что кардиопротекторный эффект изученных соединений определяется, в основном, их способностью активировать митоК$_{АТФ}$. Активация этих каналов приводит к сохранению структурно-функциональной организации митохондрий и возможности аэробного синтеза АТФ. Косвенным подтверждением этого являются полученные нами ранее данные о том, что в условиях ишемии миокарда производные уридина с одной стороны увеличивают содержание пирувата, с другой – не усиливают ацидоз, вызванный ишемией. [19].

В опытах на модельной системе бислойной липидной мембраны и на изолированных митохондриях было показано, что в ряду уридина и его фосфонуклеотидов только УДФ обладает способностью активировать митоК$_{АТФ}$ [6]. Его эффект является специфическим, так как устраняется при добавлении селективного ингибитора 5-HD. Можно предположить, что степень активности канала определяется концентрацией УДФ в клетке. Имеются данные о том, что при перфузии ишемизированного сердца раствором, содержащим уридин, увеличивается скорость его захвата миокардом [20]. Это свидетельствует о возможности активации канала не только эндогенным, но и экзогенным уридином.

В наших экспериментах было изучено изменение содержания УДФ в миокарде после введения уридина или УМФ интактным крысам и в условиях ОИМ. Установлено, что через 6 мин после введения уридина интактным животным содержание УДФ в миокарде увеличивалось в 2 раза, а при введении УМФ – в 1,3 раза по сравнению с фоновыми значениями. Эти результаты подтверждают предположение о возможности включения экзогенных уридина и УМФ в метаболические превращения с образованием УДФ в кардиомиоцитах. Не столь четкие результаты были получены у животных с ОИМ. В этом случае при введении УМФ также наблюдалось значительное увеличение концентрации УДФ (на 86% по сравнению с фоновыми значениями и на 34% по сравнению с его уровнем при ОИМ), в то время как при введении уридина отмечена лишь тенденция к увеличению содержания УДФ в миокарде. Это может быть связано с разной скоростью захвата из крови, доставки к мишени и метаболизма уридина и УМФ при ишемии, а также с разными темпами метаболизма самого УДФ в условиях нормоксии и гипоксии. Какие-либо данные относительно параметров кинетики уридина и его производных в литературе отсутствуют. Можно предположить, что пик увеличения содержания УДФ после введения нуклеозида достигается на более ранних сроках, чем 60 мин. То есть время максимального увеличения концентрации УДФ в сердце после введения уридина и УМФ может быть разным. Чтобы убедиться в правильности этого предпо-

ложения необходимо исследовать динамику изменения содержания УДФ в миокарде после введения предшественников его синтеза.

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что профилактическое применение уридина и УМФ приводит к повышению устойчивости кардиомиоцитов к недостатку кислорода в условиях острой ишемии миокарда, что проявляется в сохранении энергетического статуса, уменьшении зоны ишемического повреждения и нормализации электрофизиологических показателей миокарда. Поскольку 5-HD является специфическим ингибитором митоК$_{АТФ}$, его способность блокировать антиишемическое действие уридина и УМФ позволяет сделать вывод о ведущей роли митоК$_{АТФ}$ в реализации механизма защитного действия этих соединений на миокард при ишемическом воздействии. Активация каналов может происходить вследствие увеличения концентрации их природного активатора УДФ, метаболическими предшественниками которого являются уридин и УМФ.

Литература

1. *Garlid K.D.* Opening mitochondrial KATP in the heart – what happens, and what does not happen // Basic. Res. Cardiol. – 2000. – Vol. 95. – P. 275–279.

2. *Gross G.J.* The role of mitochondrial KATP channels in cardioprotection // Basic. Res. Cardiol. – 2000. – Vol. 95. – P. 275–279.

3. *Grover G.J., Garlid K.D.* ATP-sensitive potassium Channels: a Review of their Cardioprotective Pharmacology // Mol. Cell Cardiol. – 2000. – Vol. 32. – P. 677–695.

4. *Grigoriev S.M., Skarga Yu.Yu., Mironova G.D., et al.* Regulation of mitochondrial KATP channel by redox agents // Biochim.Biophys. Acta. – 1999. – Vol. 1410, № 1. – P. 91–96.

5. *Mironova G.D., Skarga Yu.Yu., Grigoriev S.M. et al*. Reconstitution of the mitochondrial ATP-dependent potassium channel into bilayer lipid membrane // J. Bioenerg. Biomembr. – 1999. – Vol. 31, № 2. – P. 157–161.

6. *Mironova G.D., Negoda A., Marinov B.S. et al.* Functional distinctions between the mitochondrial ATP-dependent K+ channel (mitoKATP) and its inward rectifier subunit (mitoKIR) // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279, № 31. – P. 32562–32568.

7. *Елисеев В.В., Родионова О.М., Сапронов Н.С.* Антиаритмическое и проаритмогенное действие уридина и уридиновых нуклеотидов // Вестник аритмологии. – 2000. – № 20. – С. 66–69.

8. *Matsushita S., Fanburg B.* Pyrimidine nucleotide synthesis in the normal and hypertrophying rat heart. Relative importance of the de novo and «salvage» pathways // Circ. Res. – 1970. – Vol. 27. – P. 415–428.

9. *Елисеев В.В., Родионова О.М., Сапронов Н.С. и соавт.* Влияние уридина и уридиновых нуклеотидов на работу изолированного сердца крыс при регионарной ишемии // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2002. – №2. – С. 13–15.

10. *Сапронов Н.С., Елисеев В.В., Родионова О.М.* Влияние уридиновых соединений на развитие миокардиального станинга при постишемической реперфузии сердца крысы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2000. – Т. 130, №10. – С. 411–414.

11. *Fryer R.M., Eells J.T., Hsu A.K.* Ischemic preconditioning in rats: role of miochondrial KATP channel in preservation of mitochondrial function // Am. J. Physiol. – 2000. – Vol. 278. – P. H305–H312.

12. *Frederiks W., Schellens J., Marx F. et al.* Histochemical detection of glycogen phosphorylase activity as parameter for early ischaemic damage in rat heart // Basic. Res. Cardiol. – 1993. – Vol. 88. – P. 130–140.

13. *Гампер Н.Л., Саар В.Г., Королева Е.М. и соавт.* Определение свободных нуклеотидов в тканевых, клеточных и митохондриальных экстрактах методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии // Журн. эволюц. биохим. и физиол. – 1998. – Т. 34, № 2. – С. 178–182.

14. *Ennor A., Rosenberg H*. Methods of determination phosphocreatine // Biochem. J. – 1962. – Vol. 51. – P. 606–610.

15. *Хект А.* Введение в экспериментальные основы современной патологии сердечной мышцы. – М.: Медицина,1975. – 502 с.

16. *Галенко-Ярошевский П.А., Гацура В.В.* Экспериментальные аспекты оптимизации фармакотерапии ишемии миокарда. – М.: Медицина, 2001. – 383 с.

17. *Suleiman M.S., Halestrap A.P, Griffiths E.J.* Mitochondria: Target for myocardial protection // Pharmacol. and Therap. – 2001. – Vol. 89, № 1. – P. 29–46.

18. *Kowaltowski A.J., Seetharaman S., Paucek P. et al.* Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K^+ channel of heart mitochondria // Am. J. Physiol. – 2001. – Vol. 280. – P. H649–H657.

19. *Бульон В.В., Крылова И.Б., Родионова О.М. и соавт.* Сравнительное изучение кардиопротекторных эффектов уридин-5′-монофосфата и уридин-5′-трифосфата на ранних сроках острой ишемии миокарда // Бюл. экспер. биол. – 2007. – Т. 144, № 9. – С. 297–300.

20. *Aussedat J., Ray A., Rossi A.* Uridine incorporation in normal and ishemic perfused rat hearts // J. Molecular Physiol. – 1984. – Vol. 6. – P. 247–256.

ЗНАЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ АНОМАЛИЙ В РАЗВИТИИ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ СЕРДЦА

А.Б. Малашичева, А.А. Худяков, А.А. Костарева

Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

Малашичева Анна Борисовна – кандидат биологических наук, НИЛ Молекулярной кардиологии; *Худяков Александр Александрович* – младший научный сотрудник, НИЛ Молекулярной кардиологии; *Костарева Анна Александровна* – кандидат медицинских наук, директор института Молекулярной биологии и генетики.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии имени В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. E-mail: amalashicheva@gmail.com (Малашичева Анна Борисовна).

Резюме.

Частота врожденных пороков сердца (ВПС) достаточно высока, а конкретные причины многих из них все еще не до конца понятны. В последнее десятилетие стало ясно, что большинство врожденных пороков связано с аномалиями развития сердца или околосердечных тканей, которые в свою очередь вызваны мутациями в определенных группах генов, большинство из которых являются транскрипционными факторами. В обзоре рассмотрен морфогенез сердца и группы генов, мутации в которых приводят к ошибкам в формировании сердца и как следствие – к ВПС. Обсуждаются генетические причины возникновения ВПС и возможные способы их генетической диагностики.

Ключевые слова: развитие сердца, врожденные пороки сердца, кардиогенные транскрипционные факторы.

THE ROLE OF GENETIC ABNORMALITIES IN CONGENITAL HEART DISEASES DEVELOPMENT

A.B. Malashicheva, A.A. Khudiakov, A.A. Kostareva

Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology centre, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: amalashicheva@gmail.com (Anna B. Malashicheva – Senoir Research Scientist, Scientific Research Laboratory of Molecular Cardiology).

Abstract.

The frequency of congenital heart diseases (CHD) is high enough, and the reasons of them are still poorly understood. In the last decade, it became clear that the majority of CHD is associated with anomalies of heart development, which in turn is caused by mutations in certain groups of genes? Most of which are transcription factors. The review considers the heart morphogenesis and groups of genes, mutations in which lead to errors in the heart development and cause CHD. Possible genetic causes and methods of genetic diagnostics are discussed.

Key words: heart development, congenital heart diseases, cardiac transcription factors.

Статья поступила в печать 02.09.2012, принята к публикации 14.09.2012.

Введение

Врожденными пороками сердца (ВПС) как правило, считают аномалии структуры сердца и функций, которые возникают до рождения. Такие аномалии возникают достаточно часто и имеют множество форм. ВПС возникают с частотой 19–75 на каждые 1000 живых рождений [1]. Эта цифра зависит от того, какие типы дефектов включаются, и частота возникновения будет выше, если включать в расчет не доживающих до рождения плодов [2]. Из этого числа исключены такие заболевания, как кардиомиопатии, болезни проводящей системы и дефекты латерализации (изменение положения органов относительно левоправой оси), которые также наследуются и присутствуют при рождении, но рассматриваются отдельно.

Для понимания причин ВПС необходимы глубокие знания о том, как происходит развитие сердца, так как именно разрегулировка процессов развития сердца лежит в основе его заболеваний и возникновения врожденных пороков.

Клиническая картина

ВПС затрагивают большинство частей сердца и могут быть сгруппированы в три широкие категории: синие

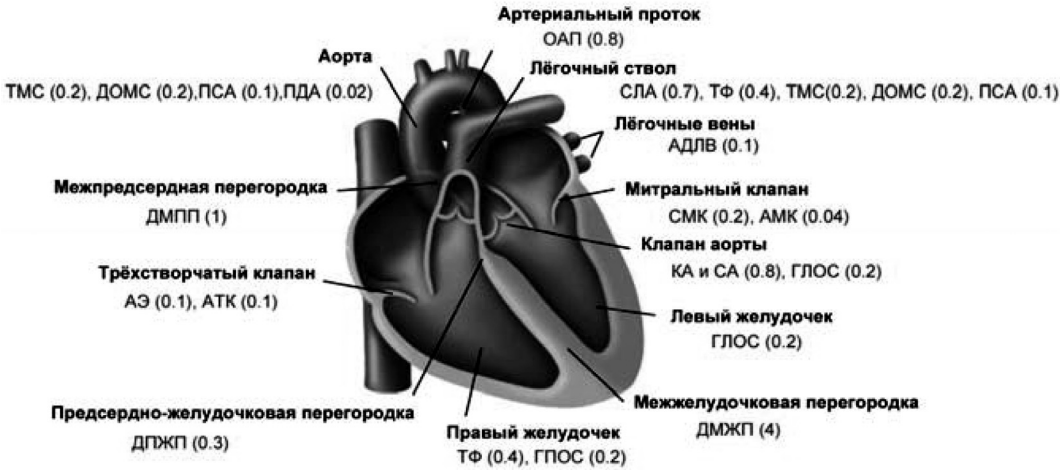


Рис. 1. Врожденные пороки сердца.

На рисунке показаны структуры, затрагиваемые врожденными пороками сердца. В скобках приведена оценка заболеваемости на 1000 живых рождений. Сокращения: АДЛВ аномальный дренаж легочных вен, АМК атрезия митрального клапана, АТК атрезия трикуспидального клапана, АЭ аномалия Эбштейна, ГЛОС гипоплазия левого отдела сердца, ГПОС гипоплазия правого отдела сердца, ДМЖП дефект межжелудочковой перегородки, ДМПП дефект межпредсердной перегородки, ДОМС двойное отхождение магистральных сосудов, ДПЖП дефект предсердно-желудочковой перегородки, КА коарктация аокты, ОАП открытый артериальный проток, ОАС общий артериальный ствол, ПДА прерванная дуга аорты, ПСА персистирующий артериальный ствол, СА стеноз аортального клапана, СЛА стеноз легочной артерии, СМК стеноз митрального клапана, ТМС транспозиция магистральных сосудов, ТФ тетрада Фалло. [3]

пороки, обструкция левого выходного тракта и дефекты септации (рис. 1) [3].

«Синие» пороки носят такое название, так как кожные покровы детей с такими пороками синеют вследствие смешивания оксигенированной и неоксигенированной крови. Дефекты, которые вносят вклад в эту группу пороков, следующие – транспозиция магистральных сосудов (ТМС), тетрада Фалло, общий артериальный ствол (неразделение на аорту и легочную артерию), аномальный дренаж легочных вен (легочные вены вместо левого впадают в правое предсердие), атрезия трикуспидального клапана, атрезия пульмонального клапана, аномалия Эпштейа (стеноз легочной артерии, атрезия трикуспидального клапана, дефект межжелудочковой перегородки), двойной выносящий тракт правого желудочка (двойное отхождение магистральных сосудов).

Вторая большая группа ВПС – левосторонние обструктивные повреждения – включают гипоплазию левого отдела сердца, стеноз митрального клапана, стеноз аортального клапана, коарктацию аорты, прерванную дугу аорты.

Третья большая группа ВПС – дефекты септации – затрагивают формирование перегородки предсердиями (дефект межпредсердной перегородки, ДМПП), желудочками (дефект межжелудочковой перегородки, ДМЖП) или формирование структур в центральной части сердца (дефект предсердножелудочковой перегородки).

Существует еще одна группа дефектов, которую нельзя строго отнести ни к одному из вышеперечисленных типов – двустворчатый клапан аорты и открытый артериальный проток (ОАП).

Смертность и заболеваемость при ВПС варьируют в зависимости от степени выраженности порока и могут быть значительными. Последствия заболевания часто очень серьезны и выражаются в необходимости хирургических вмешательств, часто нескольких, а качество жизни у пациентов с ВПС может быть сильно снижено, даже если не проводится хирургическое вмешательство. У детей с ВПС часто развиваются болезни других систем органов, что свидетельствует о серьезном вторичном влиянии ВПС на развитие всего организма на самых ранних этапах.

Хотя в настоящее время существует много доказательств генетической природы ВПС (мутаций в генах, регулирующих развитие сердца) [4], тем не менее, эпидемиологические данные указывают также на то, что неблагоприятные условия окружающей среды могут влиять на возникновение ВПС [5]. К таким факторам относят некоторые вирусные инфекции (например, краснуха), экспозицию химическим тератогенам (ретиноевая кислота, литий, дилантин, галогенизированные углеводороды), а также болезни матери, такие как, например, диабет и системная красная волчанка.

О том, что генетический компонент в возникновении ВПС присутствует, стало понятно при изучении семейных случаев с повторяемостью сходных синдромов, а также при изучении синдромов, обусловленных микроделециями, при которых затронут участок хромосомы, несущий сразу несколько генов. Но до последнего десятилетия помимо этих микроделеционных синдромов, очень мало было известно о генетических механизмах ВПС. Более того, генетики и клиницисты спорили о том, может ли вообще какое либо из ВПС быть заболеванием, причиной которого может быть повреждение всего одного гена. Запутывали эту дискуссию семейные случаи ВПС, когда в одной семье повторялись ВПС, но разного типа у разных членов семьи – например среди родственников один имел тетраду Фалло, другой – открытый артериальный проток, а третий – ДМЖП. Эти явно клинически различные фенотипы в пределах одной семьи было очень трудно объяснить. Кроме того, запутывали понимание также и умеренные (*forme fruste*) формы за-

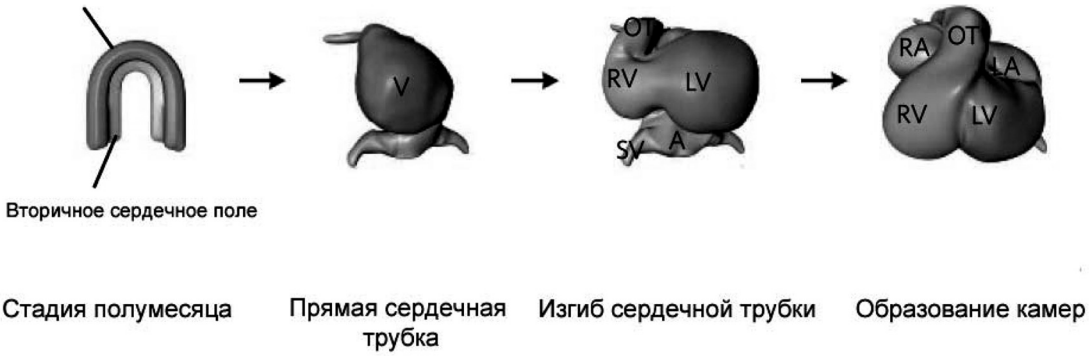


Рис. 2. Ранние стадии развития сердца.
Вид с вентральной стороны. Первичное сердечное поле дает начало левому желудочку (LV), вторичное сердечное поле принимает участие в формировании правого желудочка (RV) и позже выносящего тракта (OT), венозного синуса (SV) и левого и правого предсердий (LA и RA соответственно). V, желудочек. [3]

болеваний такие как, например ДМПП, который часто слабо выражен или остается не диагностированным, и таким образом, генетическая картина часто остается неясной.

Морфогенез сердца

Формирование сердца – это сложный процесс, который очень консервативен среди позвоночных. В эмбрионе человека первичная полоска – продольное утолщение наружного слоя зародышевого диска, из которого впоследствии мигрируют клетки мезодермы, дающей в том числе и ткани сердца – формируется на 13-й день развития, Складка мезодермальной ткани (мезодермальный гребень) формирует первичную сердечную трубку на 20-й день. В то же самое время в эмбриональном диске начинает формироваться сеть сосудов и сердечная трубка начинает сокращаться на 21–23-й день развития. На 23-й день начинается образование петли из этой трубки, и завершается к 28-му дню. В это время межжелудочковая перегородка выглядит как маленькая складка на поверхности единого желудочка, оба желудочка начинают расти, и возникают два утолщения, покрытые внеклеточным матриксом – так называемые эндокардиальные подушки. На 29-й день возникает «вздутие» в области кардиальных подушек. На 32–33 день атриовентрикулярный канал сужается и вторичная перегородка формируется из трех краев первичной перегородки. Примерно к концу 7-й недели развития межжелудочковая перегородка формируется окончательно, и выходной тракт левого желудочка полностью отделяется.

Последовательность этих событий полностью идентична у эмбрионов мыши и курицы. На этих объектах развитие сердца традиционно описывалось как сегментная модель, согласно которой небольшие порции клеток вдоль первичной полоски предрасположены (коммитированы) к определенному развитию. Отдельные сегменты линейной сердечной трубки развиваются далее в различные части сердца и при этом антериорные зоны первичной полоски формируют артериальный полюс сердца, а постериорные – венозный [6].

Клетки, не входящие в состав первичной полоски, также вносят свой вклад в дальнейшее развитие сердца. Современные генетические методы исследования посвящены, в частности, изучению работы разных генов, принимающих участие в формировании той или иной структуры, при помощи так называемых репортерных исследований, когда под промотор изучаемого гена вставляется маркерный ген, за которым можно следить по окраске, либо по флуоресцентному свечению. Таким образом, по активации гена-репортера можно говорить об активации в данной области того гена, под промотором которого стоит маркерный ген. Таким способом было показан вклад клеток, экспрессирущих различные сочетания генов, в развивающееся сердце [7–10]. В этих исследованиях была показана роль отдельных групп клеток – предшественников миокарда (так называемые myocardial progenitor cells) в формировании развивающегося сердца. В частности, в развивающемся сердце выделяют области, носящие название первичного и вторичного кардиальных полей (FHF- first heart field, SHF – second heart field, ПСП и ВСП, соответственно) по их вкладу в структуры сердца, а также по тем группам генов, которые экспрессируют клетки этих полей.

Клетки ПСП сами формируют сердечный гребень и развиваются в виде линейной сердечной трубки, формируя исключительно левый желудочек (рис. 2) [11, 12]. Клетки ВСП являются недифференцированными предшественниками миокарда, которые локализованы в области фарингеальной мезодермы медиально и каудально по отношению к сердечной трубке. Позже они мигрируют в переднюю часть сердечной трубки и участвуют в формировании выносящего тракта, правого предсердия и входящей области [13]. В настоящее время считается, что предшественники из ПСП и ВСП происходят от общей популяции предшественника еще до стадии сердечного гребня.

Было открыто и третье сердечное поле в области венозного полюса сердца [14]. На стадии сердечного гребня это поле локализовано вентрально по отношению к развивающей сердечной трубке, позднее оно дает начало рогам венозного синуса и периферии входящего тракта.

Идентификация трех сердечных полей – одно из которых вносит наибольший вклад в левый желудочек, второе – большей частью в выходной тракт, правый желудочек и предсердия и третье – в венозный полюс – поднимает важные вопросы относительно патогенеза ВПС. Очевидно, что ВПС возникает вследствие нарушений

последовательности событий в этих полях, дальнейшего неразвития или недоразвития определенного участка («кирпичика») сердца, что и приводит к возникновению ВПС.

Транскрипционные факторы как основные участники спецификации отделов сердца

Какие гены ответственны за правильное развитие областей сердца и соответственно их повреждение может приводить к возникновению ВПС? Таких генов, разумеется, очень много. В целом развитие любой структуры иерархически регулируется специфическими транскрипционными факторами. Определенные клетки в определенное время развития экпрессируют один или несколько «мастер-генов», которые в свою очередь, являясь, как правило, транскрипционными факторами, запускают экспрессию также определенной группы генов. Далее эта цепочка передачи сигнала ветвится, что приводит к возникновению клеток, экспрессирующих различные сочетания генов. Такие клетки взаимодействуют между собой, давая начало той или иной тканевой структуре.

Среди многих различных маркеров, специфически привязанных к ПСП и ВСП, существует ли какой-то один, чья экспрессия предшествовала бы экспрессии всех остальных? Иными словами, существует ли единая плюрипотентная клетка для всего сердца? Такая сердечная стволовая клетка должна быть способной дифференцироваться в такие разные фенотипы как эндотелий, гладкомышечные клетки, клетки проводящей системы и кардиомиоциты. Несколько ключевых исследований, опубликованных в последние годы, определяют сердечную стволовую клетку как мультипотентный позитивный по гену ISL-1 предшественник мезодермального происхождения (рис. 3) [15–17]. Такие клетки соответствуют требованиям быть клональными по происхождению, быть способными к самовозобновлению и способными дифференцироваться в нескольких разных направлениях. В частности, они способны к генерированию как клеток первичного, так и вторичного сердечного полей, приобретая взаимосключающие маркеры (Tbx5 для первичного поля и Isl-1 – для вторичного). Также клетки ПСП и ВСП рано экпрессируют NKX2.5.

Отметим, что позитивные по Isl-1 клетки могут быть идентифицированы также в постнатальном и взрослом сердце, что согласуется с идеей о существовании пула резидентных клеток-предшественников, участвующих в гомеостазе сердца.

Итак, «мастер-генами» кардиогенеза считают гены, которые экспрессируются клетками-предшественниками тканей сердца на самом начальном этапе развития – ISL-1, NKX2.5, TBX-5.

Действительно, ген TBX5 был идентифицирован как один из первых ключевых транскрипционных факторов кардиогенеза [18]. Мутации этого гена найдены в 75% случаев синдрома Холт-Орама, и тот факт, что этот синдром характеризуется множественными пороками развития, указывает на то, что действие поврежденного гена начинается рано в эмбриогенезе. Мыши, у которых отсутствует одна аллель гена Tbx5, рекапитулируют особенности строения и функционирования сердца человека, включая дефекты септации предсердий и дефекты

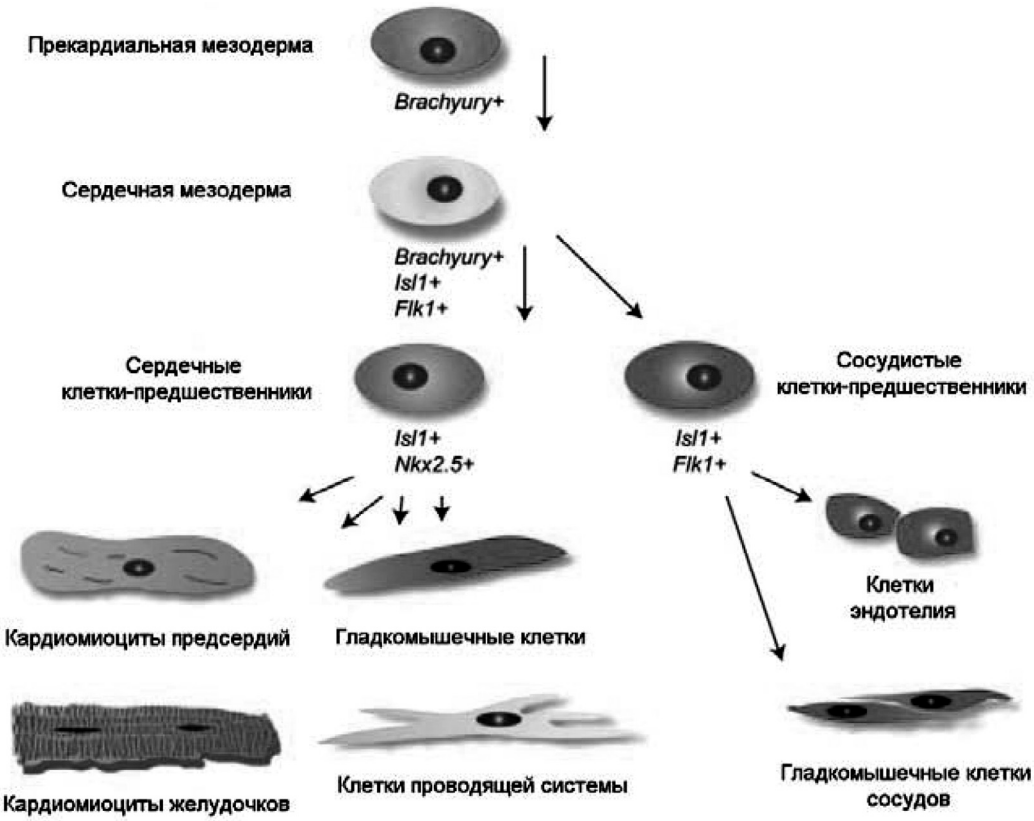


Рис. 3. Обособление линий клеток-предшественников.
Мультипотентные сердечные клетки-предшественники, происходящие из мезодермы, дают начало субпопуляциям со специфическими молекулярными признаками и фенотипом. [37]

проведения вследствие утраты трансактивации натрийуретического фактора (NPPA) и промоторов Cx40 [19].

Другие гены этого же семейства также могут отвечать за аномалии развития сердца человека. Например, мутации в гене TBX20 найдены у пациентов с дефектами септации, желудочковой дилатацией, аномалиями клапанов. У пациентов с синдромом ДиДжорджа были обнаружены делеции хромосомного района 22q11, который затрагивает ген TBX1 [20]. В последующем были найдены точечные мутации этого гена у пациентов с данным синдромом, что доказало патогенетическую роль TBX1 в возникновении наблюдаемых дефектов. Гены, которые взаимодействуют с TBX5 на уровне регуляции транскрипции, также вовлечены в патогенез ВПС. Анализ семей с наследуемыми дефектами септации предсердия с сочетанными дефектами септации желудочков, либо без них привел к идентификации мутаций в гене GATA4 – еще одном важном транскрипционном регуляторе кардиогенеза [21]. Одна из найденных мутаций нарушала способность белка Gata-4 физически взаимодействовать с Tbx5 [22]. Это наблюдение убеждает в том, что эти два гена, взаимодействуя, регулируют процессы септации сердца. Сходным образом, было открыто, что мутации в гене NKX2.5 в некоторых семьях вызывают аутосомно-доминантные дефекты септации предсердий. Последующие исследования обнаружили, что белки Nkx2.5 и Tbx5 взаимодействуют напрямую друг с другом и синергичным образом индуцируют кардиогенез [23]. Гену NKX2.5 уделяют особое внимание, так как нарушение его функций может приводить к разнообразию фенотипов. Помимо септальных дефектов, мутации этого гена встречаются у пациентов с кардиомиопатиями, дефектами выходного тракта, тетрадой Фалло, гипоплазией левого желудочка, а также с аритмиями. Изучение функционирования этого гена при полном или тканеспецифичном его отсутствии у мышей подтверждает чрезвычайно важное значение этого гена в дифференцировке кардиомиоцитов, клеток проводящей системы и гладкомышечных клеток.

ISL-1 регулирует по меньшей мере два гена связанных с ВПС – GATA4 и TBX20 [24, 25]. Более того, хотя до настоящего времени мутаций в этом гене, ассоциированных с ВПС, не было найдено, есть недавняя публикация, описывающая определенные варианты этого гена, которые предрасполагают к ВПС.

Функциональные исследования генов, необходимых для развития сердца, проводят главным образом на моделях мышей, дефектных по тому или иному гену и воспроизводящих во много ВПС, наблюдаемы у человека.

Кооперативная активация-репрессия промоторов обнаружена также и для членов семейства Tbx: Tbx2 и Tbx3 подавляют экспрессию промотора Nppa в первичном миокарде путем прямого конкурирования с Tbx5 за Nppa промотор [26, 27]. Подобные находки убеждают в такой модели контроля развития: формирование сердечной камеры происходит по умолчанию теми транкрипционными факторами, которые наиболее сильно экспрессируются в данный момент. Tbx2 и Tbx3 преодолевают эти настройки в очень тонко настроенной в пространстве манере: они экспрессруются во входящем тракте, атриовентрикулярном канале и выходном тракте, где они ингибируют экспрессию Cx40 и Nppa, а также циклина A2, который необходим для пролиферации. Интересно отметить, что эти области вносят вклад в систему проведения сердца с экпрессией в выходном тракте .Tbx3 функционирует в этих областях как репрессор генетической программы предсердия.

Tbx20 экспрессируется главным образом, но не исключительно, в первичном сердечном поле (ПСП), а также и на уровне кардиогенных подушек атриовентрикулярного и выходного тракта. Мыши, у которых отсутствует Tbx20, имеют сниженную экспрессию Nkx2.5, у них укороченная недоразвитая сердечная трубка и гипопластичный правый желудочек и выходной тракт. Этот фенотип наиболее вероятно объясняется неспособностью тканей вторичного сердечного поля произвести (добавить) достаточное количество предшественников в развивающейся сердечной трубке [28]. Более того, Tbx20 может димеризоваться с Tbx5 [29]. Он также функционально кооперирует с GATA4 и Isl1 в регуляции экспрессии Nkx2.5. Помимо этой роли в последовательном формировании структуры миокарда, Tbx20 также играет важную роль в развитии клапанов сердца. Было показано, что Tbx20 напрямую может регулировать экспрессию Tbx2 и Nmyc, а также генов внеклеточного матрикса – таких как протеогликаны и матриксные металлопротеиназы [30]. Эти результаты согласуются с моделью, в которой взаимодействие между членами семейства Tbx подавляет ремоделирование внеклеточного матрикса и запускает пролиферацию клеток в мезенхимных популяциях клеток-предшественников, образующих впоследствии клапаны.

Также подобные взаимодействия показаны для членов семейства GATA. Фенотип мышей, у которых делетирован GATA4, зависит от периода развития, во время которого происходит выключение GATA4. При ранней инактивации развивается гипоплазия миокарда и дефекты эндокардиальных подушек. Более поздняя инактивация ведет к снижению функций сердца [31]. Гетерозиготные мутации гена Gata4 вызывают у человека врожденные пороки сердца и по крайней мере частично обусловлены нарушением взаимодействий Tbx5 и GATA4 [32]. Gata4 активирует множество кардио-специфичных промоторов и взаимодействует с большим количеством других транскрипционных факторов, таких как Tbx5, Nkx2, Isl1 и семейство Klf. Эти примеры иллюстрируют, как комплексные взаимодействиямежду транскрипционными факторами и их мишенями обеспечивают развитие сердца, и как нарушения таких взаимодействий могут приводить к невыполнению жесткой программы развития сердца и как следствие – возникновению ВПС.

Точно так, как повреждение одного и того же гена может приводить к фенотипически разным заболеваниям, к одним тем же заболеваниям могут приводить мутации в разных генах. Как уже упоминалось, к дефектам септации могут приводить нарушения работы генов NKX2.5, TBX1, TBX5, TBX20 и GATA4. Другой синдром – тетрада Фалло – может быть обусловлен мутациями в генах NKX2.5, TBX1, TBX5, GATA4, но и в то же время к этому же синдрому приводят мутации в генах NOTCH1, NOTCH2, JAG1, а также он встречается у пациентов с хромосомными аномалиями, такими как синдром ДиДжоржда и синдром Дауна [33]. В недавних

полногеномных исследованиях спорадических случаев возникновения тетрады Фалло идентифицированы варианты копийности (то есть делеции или дупликации хромосомных локусов) в десяти различных участках генома, включая локусы, содержащие гены NOTCH1, JAG1. Однако, наиболее часто затронутый вариант (около 1% случаев) оказался на хромосоме 1q21 – на этом участке расположены 7 генов, ни один из которых не был ранее ассоциирован с ВПС или развитием сердца.

Несомненно, многие спорадические случаи ВПС возникают вследствие неизвестных пока генетических аномалий или вариантов взаимодействий генов и их продуктов между собой, а также частично при влиянии факторов окружающей среды. Чем больше генов будет в будущем охарактеризовано с точки зрения их участия в процессах развития сердца, тем больше мы сможем охарактеризовать конкретных генов, привязанных к определенным заболеваниям, включая ВПС, используя современные высокопроизводительные методы, такие как, например, секвенирование и анализ экзома (совокупности всех значимых последовательностей) конкретного пациента.

Работа выполнена при поддержке грантов Министерства образования и науки Российской Федерации (ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг., государственные контракты № 14.740.11.06 и № П1062).

Литература

1. *Hoffman J.I., Kaplan, S.* The incidence of congenital heart disease // J. Am. Coll. Cardiol. – 2002. – Vol. 39, № 11. – P. 1890–1900.

2. *Hoffman J.I.* Incidence of congenital heart disease: II. Prenatal incidence // Pediatr. Cardiol. – 1995. – Vol. 16, № 4. – P. 155–165.

3. *Bruneau B.G.* The developmental genetics of congenital heart disease // Nature. – 2008. – Vol. 451, № 7181. – P. 943–8.

4. *Pierpont M.E. Chair; Basson C., Benson D. et al.*Genetic basis for congenital heart defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics // Circulation. – 2007. – Vol. 115. – P. 3015–3038.

5. *Jenkins K., Correa A., Feinstein J.A., Botto L. et al.* Noninherited risk factors and congenital cardiovascular defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics // Circulation. – Vol. 115, № 23. – P. 2995–3014.

6. *Garcia-Martinez V., Schoenwolf G.C.* Primitive-streak origin of the cardiovascular system in avian embryos // Dev. Biol. – 1993. – Vol. 159, № 2. – P. 706–719.

7. *Waldo K.L., Kumiski D.H., Wallis K.T. et al.* Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field // Development. – 2001. – Vol. 128, № 16. – P. 3179–3188.

8. *Verzi M.P., McCulley D.J., De Val S., Dodou E., Black B.L.* The right ventricle, outflow tract, and ventricular septum comprise a restricted expression domain within the secondary/anterior heart field // Dev. Biol. – 2005. – Vol. 287, № 1. – P. 134–145.

9. *Kelly R.G., Brown N.A., Buckingham M.E.* The arterial poleof the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm // Dev. Cell. – 2001. – Vol. 1, № 3. – P. 435–440.

10. *Cai C.L., Liang X., Shi Y. et al.* Isl1 identifies a cardiacprogenitor population that proliferates prior to differentiationand contributes a majority of cells to the heart // Dev. Cell. – 2003. – Vol. 5, № 6. – P. 877–889.

11. *Meilhac S.M., Esner M., Kelly R.G., Nicolas J.F., Buckingham M.E.* The clonal origin of myocardial cells in different regions of the embryonic mouse heart // Dev. Cell. – 2004. – Vol. 6, № 5. – P. 685–698.

12. *Zaffran S., Kelly R.G., Meilhac S.M., Buckingham M.E., Brown N.A.* Right ventricular myocardium derives from the anterior heart field // Circ. Res. – 2004. – Vol. 95, № 3. – P.261–268.

13. *Meilhac S.M., Kelly R.G., Rocancourt D., Eloy-Trinquet S., Nicolas J.F., Buckingham M.E.* A retrospective clonal analysis of the myocardium reveals two phases of clonal growth in the developing mouse heart // Development. – 2003. – Vol. 130, № 16. – P. 3877–3889.

14. *Christoffels V.M., Mommersteeg M.T., Trowe M.O. et al.* Formation of the venous pole of the heart from an Nkx2-5-negative precursor population requires Tbx18 // Circ. Res. – 2006. – Vol. 98, № 12. – P. 1555–1563.

15. *Kattman S.J., Huber T.L., Keller G.M.* Multipotent flk-11 cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages // Dev. Cell. – 2006. – Vol. 11, № 5. – P. 723–732.

16. *Wu S.M., Fujiwara Y., Cibulsky S.M. et al.* Developmental origin of a bipotential myocardial and smooth muscle cell precursor in the mammalian heart // Cell. – 2006. – Vol. 127, № 6. – P. 1137–1150.

17. *Laugwitz K.L., Moretti A., Gruber P. et al.* Postnatal isl11 cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages // Nature. – 2005. – Vol. 433, № 7026. – P. 647–653.

18. *McDermott D.A., Bressan M.C., He J., et al.* TBX5 genetic testing validates strict clinical criteria for Holt-Oram syndrome // Pediatr. Res. – 2005. – Vol. 58, № 5. – P. 981–986.

19. *Bruneau B.G., Nemer G., Schmitt J.P.et al.* A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease // Cell. – 2001. – Vol. 106, № 6. – P. 709–721.

20. *Yagi H., Furutani Y., Hamada H. et al.* Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome // Lancet.-2003.-Vol.362, №9393.-P. 1366–1373.

21. *Garg, V., Kathiriya I.S, Barnes R. et al.* GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5 // Nature. – 2003. – № 424, 6947. – P. 443–447.

22. *Schott, J.-J., Benson D.W., Basson C.T. et al* Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5 // Science. – 1998. – Vol. 281, № 5373. – P. 108–111.

23. *Hiroi Y., Kudoh S., Monzen K. et al.* Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation // Nature Genet. –2001. – Vol. 28, № 3. – P.276–280.

24. *Stennard F.A., Costa M.W., Elliott D.A. et al.* Cardiac T-box factor Tbx20 directly interacts with Nkx2-5, GATA4, and GATA5 in regulation of gene expression in the developing heart // Dev. Biol. – 2003. – Vol. 262, № 2. – P. 206–224.

25. *Takeuchi J.K., Mileikovskaia M., Koshiba-Takeuchi K., Heidt A.B et al.* Tbx20 dose-dependently regulates transcription factor networks required for mouse heart and motoneuron development // Development. – 2005. – Vol. 132, № 10. – P. 2463–2474.

26. *Christoffels V.M., Hoogaars W.M., Tessari A., et al, Campione M.* T-box transcription factor Tbx2 represses differentiation and formation of the cardiac chambers // Dev Dyn. – 2004. – Vol. 229, № 4. – P. 763–770.

27. *Hoogaars W.M., Tessari A., Moorman A.F. et al.* The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart // Cardiovasc. Res. – 2004. – Vol. 62, № 3. – P. 489–499.

28. *Singh M.K., Christoffels V.M., Dias J.M. et al.* Tbx20 is essential for cardiac chamber differentiation and repression of Tbx2 // Development. – 2005. – Vol. 132, № 12. – P. 2697–2707.

29. *Brown D.D., Martz S.N., Binder O. et al.* Tbx5 and Tbx20 act synergistically to control vertebrate heart morphogenesis // Development. – 2005. – Vol. 132. – P. 553–563.

30. *Shelton E.L., Yutzey K.E.* Tbx20 regulation of endocardial cushion cell proliferation and extracellular matrix gene expression // Dev. Biol. – 2007. – Vol. 302, № 2. – P. 376–388.

31. *Zeisberg E.M., Ma Q., Juraszek A. et al.* Morphogenesis of the right ventricle requires myocardial expression of Gata4 // J. Clin. Invest. – 2005. – Vol. 115, № 6. – P. 1522–1531.

32. *Garg V., Kathiriya I.S., Barnes R., et al, Srivastava D.* GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5 // Nature. – 2003. – Vol. 424, № 6947. – P. 443–447.

33. *Garg V., Muth A.N., Ransom J.F. et al* Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease // Nature. – 2005. – Vol. 437, № 7056. – P. 270–274.

ИШЕМИЧЕСКИЕ И РЕПЕРФУЗИОННЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ СЕРДЦА: ОСНОВНЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ

Н.В. Нарыжная, Л.Н. Маслов

ФГБУ «Научно-исследовательский институт кардиологии» СО РАМН, Томск, Россия

Нарыжная Наталья Владимировна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник; *Леонид Николаевич Маслов* – доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией экспериментальной кардиологии.

Контактная информация: НИИ кардиологии СО РАМН, ул. Киевская 111, Томск, Россия, 634012. E-mail: Maslov@cardio.tsu.ru (Маслов Леонид Николаевич).

Резюме.

Авторы обзора проанализировали современные данные о патогенезе ишемических-реперфузионных повреждений миокарда. Рассмотрены пути клеточной гибели, основные патогенетические синдромы, такие как реперфузионная эндотелиальная дисфункция, индукция воспалительного ответа и нарушения ритма сердца. Кроме того, анализируются патофизиологические механизмы формирования этих нарушений: нарушение метаболизма жирных кислот и ионного баланса, накопление ионов Ca^{2+}, гиперпродукция активных форм кислорода и следующая за этими событиями активация протеаз, металлопротеиназ, фосфолипаз $iPLA_2$ и С, нуклеаз и поли(АДФ-рибозо)-полимеразы.

Ключевые слова: ишемия, реперфузия, миокард.

ISCHEMIC AND REPERFUSION CARDIAC DAMAGES: MAIN MANIFESTATIONS AND MOLECULAR MECHANISM

N.V. Naryzhnaya, L.N. Maslov

Federal State Budgetary Institution «Research Institute for Cardiology» of Siberian Branch under the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, Russia

Corresponding author: Federal State Budgetary Institution «Research Institute for Cardiology» of Siberian Branch under the Russian Academy of Medical Sciences, 111 Kyevskaya str., Tomsk, Russia, 634012. E-mail: Maslov@cardio.tsu.ru (Leonid N. Maslov – DM, Full Professor, Head of the Laboratory of Experimental Cardiology).

Abstract.

The authors of review analyzed the modern data on the pathogenesis of myocardial ischemia/reperfusion injury. It was examined the types of cell death, the main pathogenic syndromes such as endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury, induction of inflammatory responses and cardiac arrhythmias. Furthermore the pathophysiological mechanisms of the formation of these disturbances were analyzed: impaired fatty acid metabolism and ion balance, the accumulation of Ca^{2+} ions, hyperproduction of reactive oxygen species, and following these events, activation of proteases, metalloproteinases, phospholipases iPLA2 and C, nucleases and poly (ADP-ribose) polymerase.

Key words: myocardial ischemia, reperfusion.

Статья поступила в редакцию 25.09.2012, принята к печати 30.09.2012.

Сокращения

АМФ – аденозинмонофосфат
АФК – активные формы кислорода
ПОЛ – перекисное окисление липидов
СПР – саркоплазматический ретикулум
AIF1 – **A**poptosis **I**nducing **F**actor – 1, фактор индукции апоптоза-1
ANT – адениннуклеотидтранслоказа; Apaf1 – apoptosis protease-activating factor 1, активатор проапоптотических протеаз-1
Atg5 – autophagy-related protein 5, белок-регулятор с аутофагии
Bad – **B**cl-2-**a**ssociated **d**eath promoter – проапоптотический белок
Bak – **B**cl-2 homologous **a**ntagonist/**k**iller – проапоптотический белок
Bax – **B**cl-2 **a**ssociated protein **X**) – проапоптотический белок
Bcl-2 – **B** cell **l**ymphoma 2 – семейство апоптоз-связанных белков
Bcl-xL – **B** cell **l**ymphoma **e**xtra **l**arge) – антиапоптотический белок
Bid – **B**H 3 **i**nteracting **d**omain death agonist – проапоптотический белок
Bnip3 – **B**cl-2-binding protein **Nip3** – проапоптотический белок
FABP – fat acid binding protein, белок, связывающий жирные кислоты
FADD – **F**as-**a**ssociated **d**eath **d**omain, **F**as-связанный домен клеточной гибели
Fas – Fas-антиген, белок клеточной поверхности 45-kD, синонимы – CD95, APO-1
FasL – Fas-Ligand, лиганд Fas-антигена; GKS-3β – glycogen kinase sintase, киназа гликоген синтазы -3β
HSF-1 – фактор теплового шока-1
HSP70 – белок теплового шока-70
$iPLA_2$ – **i**ndependent **P**hospholipase A2, независимая фосфолипаза A_2
JNK – c-**J**un **N**-terminal **k**inas
Mcl-1 – **m**yeloid **c**ell **l**eukaemia-1 – антиапоптотический белок
MMP – matrix metalloprotease
МРТ-пора – mitochondrial permeability transition pore, пора переменной проницаемости митохондрий
NAD – никотинамидадениндинуклеотид
NCX – sodium/calcium exchanger, Na^+/Ca^{2+}-антипортер
NHE – sodium/hydrogen exchanger, Na^+/H^+-антипортер
no-reflow – феномен невосстановленного кровотока
Omi/HtrA2 – **h**igh **t**emperature **r**equirement protease **A2**, белок, связывающий XIAP
PARP – поли(АДФ-рибозо)-полимераза
PI3K – phosphatidylinositol-3-kinase, фосфоинозитол трифосфат-активируемая протеинкиназа;
PiC – inorganic phosphate carrier, фосфатный канал
SERCA2a – sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase 2a, Ca^{2+}-АТ-Фаза саркоплазматического ретикулума 2а
Smac/DIABLO – **s**econd **m**itochondria-derived **a**ctivator of **c**aspase / **D**irect **I**AP **B**inding **p**rotein with **lo**w pI, вторичный активатор каспаз митохондриального происхождения/белок, связывающий **I**AP
TIMP-2 – tissue inhibitor of metalloproteases
TLR4-рецепторы – tool like receptors-4
TNFα – timor necrosis factor-α, фактор некроза опухолей-α
VDAC – voltage-associated anion channel, потенциал-зависимый анионный канал, порин
XIAP – X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein, Х-связанный ингибитор апоптоза

1. Основные проявления ишемического и реперфузионного повреждения миокарда

Исследование механизмов формирования ишемического-реперфузионного повреждения миокарда и разработка новых, патофизиологически обоснованных путей его коррекции, является важной задачей современной медицинской науки, поскольку клиническое проявление ишемии сердца – острый инфаркт миокарда – продолжает оставаться социально-значимым заболеванием, которое приводит к сокращению продолжительности, ухудшению качества жизни и снижению трудоспособности населения [2, 9].

Гибель кардиомиоцитов при ишемии-реперфузии может происходить путем некроза, апоптоза или аутофагии [1, 4].

Апоптоз. Экспериментальными исследованиями было показано, что в первые 2–4 ч после коронарооклюзии большинство гибнущих клеток имеют морфологические признаки апоптоза [43]. В соответствии с оригинальным описанием апоптоза [47], он характеризуется конденсацией и фрагментацией хроматина и уменьшением объема клетки. Гибель клеток путем апоптоза приводит к образованию апоптотических телец, которые содержат клеточные органеллы, клеточная мембрана при этом не повреждена. Апоптотические тельца могут фагоцитироваться макрофагами, поэтому, апоптоз не сопровождается воспалительной реакцией.

Апоптоз может быть инициирован как экстраклеточными сигналами, так и внутриклеточными. В настоящий момент предполагается, что экстраклеточная активация апоптоза связана со стимуляцией TNFα-рецепторов и Fas-рецепторов, которые могут быть активированы циркулирующими в крови TNFα или Fas-лигандами, выделяемыми клетками-киллерами [42]. Fas-лиганды (FasL) – трансмембранные белки, расположенные на мембранах макрофагов, Т-лимфоцитов и эндотелиальных клеток [74]. FasL могут быть переведены в растворимую (циркулирующую) форму (sFasL) матриксными металлопротеиназами (MMP-7) [73].

Все апоптоз-индуцирующие рецепторы на поверхности клетки связаны с Fas-ассоциированным доменом FADD (**F**as-**a**ssociated **d**eath **d**omain), который, в свою очередь, активирует несколько классов протеаз, в частности – каспазу 8. Последняя активирует эффекторные каспазы 3 и 7, непосредственно осуществляющие гибель клетки при апоптозе [115].

Внутриклеточный запуск апоптоза регулируется балансом про- и антиапоптотических белков. Большинство из них ассоциированы с митохондриями. Это семейство белков Bcl-2 (B cell lymphoma 2), которые присутствуют на митохондриальной мембране. Белки группы Bax: Bax (Bcl-2 associated protein X), Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer), Bad (Bcl-2-associated death promoter), Bid (BH 3 interacting domain death agonist), Bnip3 (E1B 19K/Bcl-2-binding protein Nip3) являются проапоптотическими. Белки семейства Bcl: Bcl-2, Bcl-xL (B cell lymphoma extra large) и Mcl-1 (myeloid cell leukaemia-1) являются антиапоптотическими [54]. Ряд белков (например, Bax и Bak) обнаружены в эндоплазматическом ретикулуме. Ингибирование проапоптотических белков или, напротив, увеличение экспрессии антиапоптотических приводит к уменьшению ишемического-реперфузионного повреждения сердца. Так, мыши, нокаутирован-

ные по гену проапоптотического белка Bax, оказались более устойчивыми к ишемическому-реперфузионному повреждению [37]. Аналогичный эффект был получен у животных с гиперэкспрессией антиапоптотического белка Bcl-2 [40]. В результате изменения баланса про- и антиапоптотических факторов митохондрий происходит изменение проницаемости внешней митохондриальной мембраны: образование пор переменной проницаемости (МРТ-пора, mitochondrial permeability transition pore). Открытие этих пор сопровождается набуханием митохондрий, разрывом внешней митохондриальной мембраны, падением трансмембранного потенциала и выходом цитохрома ***c***. Вместе с цитохромом ***c*** из митохондрий выходят другие проапоптотические факторы: AIF1 (**A**poptosis **I**nducing **F**actor – 1), Smac/DIABLO (**s**econd **m**itochondria-derived **a**ctivator of **c**aspase / **D**irect **I**AP **B**inding **p**rotein with **l**ow **p**I), Omi/HtrA2 (**h**igh **t**emperature **r**equirement protease **A2**). Кроме того, возможно Bax/Bak-зависимое увеличение мембраной проницаемости митохондрий с образованием Bax/Bak-поры, которая, так же как и в случае образования МРТ-поры, высвобождает цитохром ***c*** [32]. В цитозоле цитохром ***c*** связывается с адаптерным белком Apaf1 (apoptosis protease-activating factor 1) и при участии молекулы АТФ образует апоптосому [65]. Присоединение к апоптосоме неактивного фермента прокаспазы 9 приводит к образованию активной каспазы 9, которая, в свою очередь, активирует каспазу 3 и 7 [70].

В физиологических условиях эффекторные каспазы (3 и 7) ингибируются X- связанным ингибитором апоптоза (X-linked Inhibitor of Apoptosis protein, XIAP) [22], усиление экспрессии которого ограничивает развитие апоптоза и некроза [49]. Открытие МРТ-поры или Bax/Bak-поры может обеспечивать освобождение из митохондрий не только цитохрома ***c***, но и других про-апоптотических факторов, например, Smac/DIABLO или Omi/HtrA2, которые связываются XIAP и ингибируют его [22]. Эндонуклеаза G, независимо от каспаз, транслоцируется в ядро клетки и вызывает разрушение хроматина [54].

В настоящий момент принято считать, что апоптоз является обратимым процессом, но лишь на начальном этапе. Достигнув определенной стадии (предполагают, что это активация каспазы 3 и падение трансмембранного потенциала митохондрий), процесс апоптоза проходит так называемую «точку невозврата» и приводит к гибели клетки [70].

Некротическая гибель кардиомиоцита характеризуется повреждением плазматической мембраны и освобождением цитозольных компонентов, в результате чего развивается воспалительный ответ [25], который является одним из основных механизмов ишемического-реперфузионного повреждения. Основными патогенетическими факторами, вызывающими повреждение клеточной мембраны, являются: повышение внутриклеточного содержания ионов Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$), выработка активных форм кислорода (АФК) и последующая активация протеазы калпаина и Ca^{2+}-зависимой фосфолипазы A_2 (последняя разрушает сарколемму), отек и набухание кардиомиоцитов [12, 14, 18, 50, 59].

Аутофагия. Третьим путем клеточной гибели, наблюдающейся при ишемии-реперфузии, является аутофагия. В физиологических условиях аутофагия направлена на удаление поврежденных органелл, таких как митохондрии и саркоплазматический ретикулум (СПР) [103]. Кроме этого, аутофагия обеспечивает клетку питательными веществами при их дефиците. Распространенная аутофагия приводит к гибели клетки. Морфологически она выявляется присутствием многочисленных аутофагических вакуолей (аутофаголизосом) [100]. Процесс аутофагии включает: индукцию, формирование аутофагосом, слияние аутофагосом с лизосомами и деградацию аутофаголизосом [103]. Активации аутофагии во время ишемии происходит под влиянием увеличения $[Ca^{2+}]_i$ [39], повышения уровня АМФ с последующей стимуляцией АМФ-активируемой протеинкиназы [67]. Кроме того, аутофагия зависит стимуляции беклина-1 (beclin-1), белка, признанного одним из важнейших триггеров аутофагии [103, 67]. Считают, что для образования аутофагосом важным событием является также активация белка Atg5 (**a**u**t**opha**g**y-related protein 5) [69].

Вопрос о вкладе аутофагии в ишемическое-реперфузионное повреждение остается дискуссионным. В последние годы сформировалось мнение о благоприятном влиянии инициирования аутофагии при ишемии-реперфузии как альтернативе некрозу и апоптозу [103]. Так, несколькими исследованиями показано усугубление повреждения кардиомиоцитов при ингибировании запуска аутофагии в фазу ишемии [23, 44]. Обнаружено, что подавление экспрессии беклина-1 снижает ишемическую и реперфузионную активацию аутофагии и увеличивает клеточную гибель [103], что говорит о благотворной роли аутофагии. Механизм этого явления до сих пор неясен. Предполагают, что ингибирование аутофагии приводит к инициированию апоптоза и некроза [103]. При этом некоторые исследователи высказывают предположение о том, что путь аутофагии более благоприятен для клетки из-за того, что этот процесс обратим на большем промежутке времени, чем процесс некроза или апоптоза, и не имеет так называемой «точки не возврата», после которой гибель клетки становится необратимой [23, 44, 103].

Показано, что кратковременная ишемия приводит в большей степени к индукции аутофагии и апоптоза, а длительная инициирует некротическую гибель клеток [62]. Следует отметить, что ни на одной модели ишемии или ишемии-реперфузии невозможно добиться какого-либо одного типа клеточной гибели, неизбежно возникновение мозаичной картины из клеток, гибнущих по всем трем механизмам. Так, например, распределение TUNEL-позитивных (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated UTP nick end-labelling) клеток (характерный маркер апоптоза) в зоне инфаркта наблюдается ближе к границам зоны инфаркта, а в центральной области преобладают клетки, погибшие путем некроза [106].

Эндотелиальная дисфункция. Описывая события, происходящие в течение ишемии и реперфузии в кардиомиоцитах, нельзя не затронуть такой важный компонент ишемического-реперфузионного повреждения миокарда, как дисфункция эндотелия.

В 1974 г Kloner R.A. и соавт. [52], обнаружили, что после длительной (90 мин) коронарооккклюзии, в отличие от менее продолжительной 40-минутной, не удается пол-

ностью восстановить коронарный кровоток. Это явление было названо феноменом no-reflow. В настоящий момент феномену no-reflow уделяется большое внимание исследователей, поскольку он широко распространен в реальной клинической практике. У многих пациентов с острым инфарктом миокарда (до 30%) восстановить коронарную перфузию в полном объеме не удается, несмотря на успешную реканализацию инфаркт-связанной коронарной артерии [14].

Электронная микроскопия в зоне no-reflow позволила обнаружить поврежденные эндотелиоциты, микротромбы и нити фибрина в микрососудах [51]. Изначально авторы предположили, что феномен no-reflow мог быть следствием повреждения эндотелиоцитов и результатом формирования микротромбозов. Однако более поздними исследованиями этих же авторов предположение о микротромбировании коронарных артериол при no-reflow было опровергнуто, поскольку инфузия тромболитического фермента стрептокиназы не повлияла ни на размер инфаркта, ни на состояние микроциркуляторного русла [51].

В 1987 г K.M. VanBenthuysen и соавт. подтвердили важную роль реперфузионной эндотелиальной дисфункции коронарных артерий в феномене no-reflow при экспериментах на изолированных коронарных артериях собак [108]. Оказалось, что во время реперфузии, следующей за 60-минутной ишемией, усиливается вазоконстрикторная реакция на эргоновин (агонист α-адренорецепторов и серотониновых 5-HT_2-рецепторов) и снижается ацетилхолин-индуцированная вазорелаксация, в то время как реакция на нитропруссид натрия (донор $NO^{\bullet}$) оставалась неизменной. Таким образом, этими исследованиями было доказано, что ишемия-реперфузия приводит к усилению реакции артериальной стенки на вазоконстрикторные агенты и нарушает эндотелий-зависимое расслабление коронарных артерий. Эти данные были подтверждены другими исследователями [20, 107]. Эти и последующие работы позволили выявить важную роль уменьшения продукции $NO^{\bullet}$ [107], а так же вклад свободных радикалов [20] в реперфузионное нарушение вазорелаксации.

Реперфузионная эндотелиальная дисфункция после кратковременной ишемии (15 мин) носит транзиторный характер, а после длительной ишемии (60 мин) нарушение функции эндотелия сохраняется в течение двух недель [38]. Полное восстановление эндотелий-зависимой вазодилатации отмечается только через 9 недель после реперфузии [38].

В настоящий момент предполагается, что, помимо нарушения эндотелий-зависимой вазодилатации, определенную роль в формировании феномена no-reflow играют следующие события: (1) отек и набухание эндотелия; (2) микроэмболия; (3) повышение вязкости крови, (4) активация нейтрофилов, (5) агрегация тромбоцитов [66].

Воспаление. Не менее значимым патофизиологическим событием, происходящим в инфарцированном миокарде, следует признать реакцию иммунной системы на ишемию и реперфузию [66]. При этом происходит мобилизация и активация нейтрофилов, инфильтрация ткани миокарда лейкоцитами и выброс цитокинов из иммунных клеток [66]. Механизм передачи патогенного сигнала с клеток иммунной системы на кардиомиоциты включает усиление свободнорадикального повреждения мембран миокарда активными формами кислорода, генерируемыми иммунными клетками, отек эндотелия, микротромбозы и активацию внутриклеточных сигнальных каскадов апоптоза через Fas-, TNFα- и TLR4-рецепторы [14, 42] Так, обнаружено, что активированные нейтрофилы выбрасывают вазоактивные вещества – тромбоксан А2, фактор активации тромбоцитов и лейкотриен В4, вызывающие вазоконстрикцию и воспалительную реакцию [66], внося, таким образом, значимый вклад в формирование феномена no-reflow. Активация Т-клеток иммунной системы способствует экспрессии и высвобождению Fas-лигандов и инициации внеклеточного пути апоптоза [42]. Обнаружено, что блокирование активации нейтрофилов при экспериментальной коронароокклюзии (90 мин) и реперфузии (48 ч) у собак путем введения антител к белку адгезии нейтрофилов CD18 приводит к уменьшению соотношения размер инфаркта/зона ишемии на 50% [10]. Кардиологи из США [24] попытались выяснить, как влияют антитела к интегринам CD11/CD18 (интегрины – белки, обеспечивающие адгезию клеток) на размер инфаркта у пациентов острым крупноочаговым инфарктом миокарда, которым выполняли ангиопластику инфаркт-связанной артерии. Размер инфаркта оценивали сцинтиграфически с радиофармпрепаратом ^{99m}Tc-SESTAMIBI. Оказалось, что антитела к CD11/CD18 не влияют на размер инфаркта [24]. Некоторые авторы на основе клинических данных ставят под сомнение связь генерации АФК иммунными клетками с реперфузионным повреждением [36]. Все эти факты говорят о том, что роль иммунного ответа в ишемическом-реперфузионном повреждении в реальных клинических условиях нуждаются в дальнейшем изучении.

Нарушения ритма сердца являются одним из жизнеугрожающих проявлений острой ишемии-реперфузии. В разные стадии ишемии и реперфузии аритмии имеют различные механизмы формирования. Так, в период ишемии принято различать раннюю (1) фазу, когда значительная часть кардиомиоцитов остается жизнеспособной (до 90 минут) и позднюю (2) фазу, когда в ишемизированном участке преобладают некротические изменения [87]. Первую фазу разделяют на стадии 1a (первые 10 минут ишемии) и 1b (10–60 минут). На стадии 1a нарушения ритма возникают по механизму «re-entry», в фазу ишемии (1b), позднюю (2) фазы и при реперфузии – как по re-entry, так и при участии эктопического автоматизма [92].

Феномен re-entry вызван задержкой возбуждения кардиомиоцитов ишемизированой области, в результате чего становится возможным повторное вхождение возбуждающего импульса в один и тот же регион и возникновение внеочередного импульса. Это происходит из-за замедления деполяризации кардиомиоцитов в зоне ишемии [8]. Показана важная роль увеличения $[Ca^{2+}]_i$ в индукции ишемических и реперфузионных нарушений ритма [50, 118, 119].

Установлено, что в аритмогенезе важную роль играет повреждение межклеточных контактов и их основного компонента – белка коннексина [93]. Разрушение коннексина во время ишемии приводит к замедлению про-

ведения импульса и, соответственно, к возникновению аритмий по механизму re-entry [93].

2. Патогенез повреждения кардиомиоцитов при ишемии и реперфузии

Общеизвестно, что нарушение нормального функционирования кардиомиоцитов и последующая их гибель в период прекращения кровоснабжения миокарда происходит главным образом из-за недостаточности кислорода и энергетических субстратов. Недостаток кислорода и субстратов во время ишемии имеет три основных патофизиологических следствия: 1) перестройка энергетического метаболизма кардиомиоцитов, основным источником энергии которых в норме является β-окисление жирных кислот, на гликолитический путь [63]; 2 изменение работы ионных каналов, в том числе, из-за нехватки АТФ, ведет к нарушению ионного гомеостаза клетки [81]; 3) повышение продукции АФК избыточно восстановленными цитохромами дыхательной цепи митохондрий [61]. Следует подробнее остановиться на этих моментах.

Изменение метаболизма жирных кислот при ишемии. Основными последствиями ишемии являются: недостаток кислорода, питательных веществ и снижение элиминации продуктов метаболизма из ишемизированного региона миокарда [78]. Нехватка кислорода приводит к нарушению окислительного фосфорилирования и, соответственно, к быстрому снижению производства АТФ при окислении жирных кислот и пирувата, при этом степень дефицита АТФ зависит от степени ишемии [78]. Для компенсирования энергетического дефицита в условиях ишемии активируется анаэробный путь окисления углеводов – гликолиз и гликогенолиз, что приводит к ускорению восстановления лактатдегидрогеназой пирувата до лактата с последующим накоплением лактата и протонов $[H^+]_i$ [88]. Вследствие ингибирования окислительного фосфорилирования происходит увеличение уровня NADH (никотинамидадениндинуклеотид) и FADH2 (флавинадениндинуклеотид) [78]. Известно, что ацил-КоА-дегидрогеназа и 3-КоА-гидроксиацил-дегидрогеназа, катализирующие β-окисление жирных кислот, чувствительны к окислительно-восстановительному состоянию митохондриального матрикса (коэффициентам NAD^+/NADH и $FAD^+/FADH_2$) [78]. Следствием снижения коэффициентов NAD^+/NADH и $FAD^+/FADH_2$ является ингибирование β-окисления жирных кислот, увеличение их концентрации в клетке и накопление промежуточных продуктов метаболизма жирных кислот в различных клеточных компартментах [89]. Производное жирных кислот ацил-КоА накапливается в матриксе митохондрий. Этот пул КоА способствует разрушению митохондриальных крист с образованием аморфных внутримитохондриальных уплотнений, что в конечном итоге может нарушить функцию митохондрий [89].

Изменение ионного баланса в кардиомиоцитах и его последствия при ишемии и реперфузии. Гликолиз в отсутствие последующего аэробного окисления пирувата приводит к накоплению в клетке лактата и протонов [88]. Падение pH вызывает активизацию Na^+/H^+-антипортера (NHE1, sodium/hydrogen exchanger), что приводит к росту концентрации внутриклеточных ионов натрия ($[Na^+]_i$) [113]. Дополнительный рост $[Na^+]_i$ обуславливается ингибированием Na^+/K^+-АТФазы из-за снижения внутриклеточной концентрации АТФ [72].

В результате увеличения $[Na^+]_i$ происходит подъем концентрации внутриклеточного $[Ca^{2+}]_i$ [76], потому что Na^+/Ca^{2+}-антипортер (NCX), который обычно транспортирует Ca^{2+} из клетки, начинает транспортировать Ca^{2+} в клетку. Этот процесс лежит в основе накопления ионов Ca^{2+} в саркоплазме кардиомиоцитов во время ишемии, что является одним из наиболее важных факторов ишемического повреждения кардиомиоцитов [76]. Вторым по значимости механизмом перегрузки кардиомиоцитов ионами кальция принято считать ингибирование захвата ионов кальция саркоплазматическим ретикулумом вследствие нарушения работы Ca^{2+}-АТФазы СПР (SERCA2a) – основного ионного насоса, обеспечивающего диастолическое снижение $[Ca^{2+}]_i$ в саркоплазме [26]. Подобное снижение активности SERCA2a происходит: (1) из-за недостатка АТФ, как энергетического субстрата для SERCA2a; (2) дефосфорилирования белка фосфоламбана, являющегося в дефосфорилированном состоянии ингибитором SERCA2a [97]; (3) повреждения SERCA2a Ca^{2+}-активируемыми протеазами [84]. Поврежденный SERCA2a не только снижает захват Ca^{2+}, но и способствует его пассивной утечке из СПР [79]. О важной роли дисфункции SERCA2a при ишемическом повреждении говорят данные, появившиеся в последние годы [120]. Так, в опытах на изолированных кардиомиоцитах новорожденных крыс обнаружено значительное снижение экспрессии гена SERCA2a при моделировании гипоксии и реоксигенации in vitro, в то время как гипоксия и реоксигенация на фоне ишемического прекондиционирования, обладающего кардиопротекторным действием, этого эффекта не вызывала [120]. В качестве еще одного механизма ишемической перегрузки кардиомиоцитов ионами Ca^{2+} рассматривают нарушение работы сарколеммальной Ca^{2+}-АТФазы. В физиологических условиях этот фермент обеспечивает удаление ионов кальция из цитоплазмы кардиомиоцитов. Снижение его активности и сродства к Ca^{2+} наблюдается уже при 15-минутной ишемии, что может обуславливать перегрузку саркоплазмы ионами Ca^{2+} [111].

Если во время ишемии внутриклеточный pH снижен, то во время реперфузии pH восстанавливается до нормального. Тем не менее, в начале реперфузии внутриклеточный pH остается сниженным, вследствие чего за счет обмена H^+ на Na^+ в цитоплазму продолжает поступать Na^+ через NHE1. Избыток Na^+ удаляется из саркоплазмы Na^+/K^+-АТФазой и NCX (sodium/calcium exchanger, Na^+/Ca^{2+}-антипортер) в обмен на $[Ca^{2+}]_i$, что приводит к непродолжительному, но интенсивному увеличению $[Ca^{2+}]_i$ и возникновению связанных с ними реперфузионных аритмий. В частности, показано, что избыточное накопление ионов Ca^{2+} в кардиомиоцитах вызывает задержанную постдеполяризацию, триггерную активность и, как следствие, следующие за этим жизнеугрожающие тахиаритмии [50]. В экспериментах с биолюминисцентным Ca^{2+}-зондом акварином обнаружено, что возрастание $[Ca^{2+}]_i$ в кардиомиоцитах выше 1,5 мкМ сопровождается возникновением фибрилляции желудочков [48]. В дальнейших исследованиях с использованием другого

флюоресцентного Ca^{2+}-зонда Indo-1 обнаружена обратная зависимость между $[Ca^{2+}]_i$ и порогом фибрилляции желудочков [119]. Причиной этих изменений является то, что при высокой $[Ca^{2+}]_i$ в кардиомиоцитах происходит спонтанный, не обусловленный деполяризацией сарколеммы, выброс ионов Ca^{2+} из СПР [48, 55]. Подобные осцилляции Ca^{2+} могут вызывать задержанную постдеполяризацию и, как следствие, тахикардию и фибрилляцию желудочков [55]. Кроме того, перегрузка кардиомиоцитов кальцием может способствовать замедлению проводимости биоэлектрических импульсов и возникновению аритмий по типу re-entry [50].

В некоторых кардиомиоцитах $[Ca^{2+}]_i$ остается неизменно высокой на протяжении всей реперфузии. Нормализация уровня $[Ca^{2+}]_i$ определяется уровнем энергетического метаболизма (содержание АТФ), внутриклеточным уровнем Na^+ и степенью повреждения белков рианодиновых рецепторов СПР (Ca^{2+}-каналы СПР) во время ишемии [125]. Важная роль дисфункции СПР в реперфузионном повреждении и нарушении сократимости подтверждается тем, что ее устранение за счет усиления захвата Ca^{2+} саркоплазматическим ретикуломом приводит к значительному улучшению постишемического восстановления сократимости миокарда и уменьшению размера инфаркта [21]. Так, например, трансфекция рекомбинантного аденовирусного вектора SERCA2a в область верхушки миокарда за 2–6 дней до моделирования ишемии приводит к значительному улучшению постишемического восстановления сократимости миокарда, уменьшению размера инфаркта и снижению частоты возникновения аритмий [21].

Таким образом, во время ишемии и реперфузии несколько патологических процессов приводят к существенному повышению $[Ca^{2+}]_i$. Так, если при физиологических условиях в кардиомиоцитах диастолическая концентрация Ca^{2+} составляет 10^{-7}М, то при ишемии-реперфузии диастолическая $[Ca^{2+}]_i$ может увеличиваться в 5 раз, что обеспечивает возникновение контрактуры, способствует возникновению аритмий и необратимых повреждений кардиомиоцитов [6, 7, 48, 76].

Захват ионов кальция митохондриями в некоторой степени компенсирует повышенное $[Ca^{2+}]_i$ в саркоплазме. Этот процесс осуществляет Ca^{2+}-переносчик, который использует для этого энергию трансмембранного потенциала митохондрий ($\Delta\psi$) [31]. Таким образом, для транспорта Ca^{2+} в митохондрии не нужна энергия АТФ. Митохондриальный Ca^{2+}-переносчик ингибируется рутением красным и его производными. Несмотря на многочисленные исследования, посвященные изучению входящего митохондриального кальциевого тока, этот унипортер выделен только недавно [30], но до сих пор не клонирован. Вход Ca^{2+} в митохондрии через Ca^{2+}-переносчик сопровождается падением $\Delta\psi$. Таким образом, во время ишемии при ингибировании транспорта электронов из-за недостатка кислорода 8 можно ожидать, что захват Ca^{2+} митохондриями приведет к падению $\Delta\psi$, ограничивая тем самым дальнейший захват митохондриями Ca^{2+}. Однако большинство исследований свидетельствует об увеличении уровня митохондриального Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_m$)во время ишемии [28, 76, 91]. Причина этого парадоксального эффекта в том, что в регулирование $[Ca^{2+}]_m$ в митохондриях при ишемии включается Na^+/Ca^{2+}-обменник (митохондриальный NCX, mNCX) [28]. Митохондриальный Na^+/Ca^{2+}-обменник является основным каналом, через который ионы кальция выходят из митохондрий [31]. Этот ионный канал чувствителен к митохондриальной концентрации $[Na^+]$ [31]. При ишемии из-за снижения градиента pH между митохондриальным матриксом и саркоплазмой происходит инверсия работы митохондриального NHE, ионы Na^+ поступают внутрь митохондрий и происходит их избыточное накопление в митохондриальном матриксе [105]. Повышение митохондриальной концентрации Na^+ индуцирует инверсию работы митохондриального Na^+/Ca^{2+}-обменника (mNCX), что приводит к возрастанию $[Ca^{2+}]_m$. Доказательством этому служат эксперименты E.J. Griffiths и соавт., которые наблюдали отсутствие роста $[Ca^{2+}]_m$ во время ишемии при ингибировании mNCX селективным ингибитором этих каналов клоназепамом [28]. Эти данные свидетельствуют о том, что mNCX во время ишемии способствует нагрузке митохондрий ионами кальция. Во время реперфузии происходит восстановлении градиентов $[Na^+]$ и pH. При этом ингибирование mNCX во время реперфузии, в противоположность ишемии, приводит к возрастанию $[Ca^{2+}]_m$. Этот факт свидетельствует о восстановлении нормальной работы mNCX, при которой ионы Ca^{2+} удаляются из митохондрий, то есть инверсии работы mNCX во время реперфузии не наблюдается [28]. Блокирование mNCX в периоды ишемии и реперфузии приводит к разнонаправленному изменению $[Ca^{2+}]_m$, что говорит о том, что в эти промежутки времени ток Ca^{2+} через mNCX направлен в противоположные стороны.

Захват Ca^{2+} митохондриями является естественным механизмом, позволяющим компенсировать прогрессирующее нарастание Ca^{2+}-перегрузки цитоплазмы во время ишемии. Установлено, что транспорт Ca^{2+} в митохондрии снижает синтез АТФ [85], тем самым усугубляя энергетический дефицит. Однако искусственное замедление захвата Ca^{2+} митохондриями путем блокирования митохондриального Ca^{2+}-унипорта рутением красным во время ишемии приводит к усилению реперфузионного повреждения кардиомиоцитов [91]. Вместе с тем, обнаружена связь между кардиопротекторной активностью некоторых соединений, таких как диазоксид или ингибитор сарколеммального NCX (SEA0400) и их способностью снижать $[Ca^{2+}]_m$ [71, 76]. Это связано с тем, что во время реперфузии $[Ca^{2+}]_m$ имеет максимум, который составляет 0,3-0,4 мкМ [28], выше которого его избыток способствует усугублению повреждающего действия ишемии и последующей реперфузии. Это пороговое значение обусловлено наличием в митохондриях МРТ-пор, чувствительных к концентрации $[Ca^{2+}]_m$ [34].

МРТ-пора, встроенная во внутреннюю и внешнюю мембрану митохондрий, обеспечивает проницаемость мембран для ионов и некоторых белков [34, 54]. Эти поры закрыты в физиологических условиях. До настоящего времени молекулярная структура МРТ-пор полностью не раскрыта и между исследователями ведется оживленная дискуссия относительно строения МРТ-пор. На сегодняшний день обнаруженя два мембранных компонента МРТ-поры и несколько регуляторных белков, непосредственно связанных с образованием МРТ-пор.

По мнению проф. A.P. Halestrap, мембранно-связанными субъединицами МРТ-поры являются адениннуклеотидтранслоказа (ANT) и фосфатный канал (inorganic phosphate carrier, PiC) [34]. До недавнего времени, одной из мембранно-связанных структурных единиц считали потенциал-зависимый анионный канал VDAC (порин) [101]. Однако A. Krauskopf и соавт. [53] опровергли это предположение, показав возможность образования МРТ-пор в митохондриях у VDAC1-нокаутных мышей. С МРТ-порой связаны регуляторные белки: циклофилин D (CyPD), протеин митохондриального матрикса, являющийся мишенью для ингибитора МРТ-пор циклоспорина А; гексокиназа II; креатинкиназа; антиапоптотический белок Bcl-2; проапоптотический белок Bax [34, 54]. Роль киназы гликоген синтазы-3β (GKS-3β) в регуляции МРТ-пор остается пока спорной.

Большинство авторов свидетельствуют о том, что МРТ-поры остаются закрытыми в период ишемии и открываются лишь при наступлении реоксигенации [Halestrap AP., 2010]. Предполагают, что время реперфузии открытие МПТ-пор тормозят протоны [19]. Основными условиями, необходимыми для открытия МРТ-поры является повышение концентрации митохондриального $[Ca^{2+}]_m$ и чрезмерная выработка АФК [34]. Как мы уже упоминали выше, во время реперфузии Ca^{2+}-перегрузка кардиомиоцитов и продукция АФК усиливаются, поэтому основной причиной гибели клеток миокарда становится апоптоз [34].

Важнейшей функцией МРТ-поры является индукция апоптоза и некроза при ее открытии. Таким образом, состояние МРТ-поры считается «точкой принятия решений» – пока клетка в состоянии сопротивляться ишемии, пора остается закрытой. Открытие МРТ-поры и последующее критическое падение трансмембранного потенциала митохондрий рассматривается как «точка невозврата» – считают, что процесс апоптоза при этом становится необратимым [34].

Открытие МРТ-поры сопровождается набуханием митохондрий [57], что приводит к разрыву внешней митохондриальной мембраны, быстрому угнетению всех митохондриальных функций, выходу в цитоплазму цитохрома ***c***, ряда проапоптотических белков и инициированию апоптоза или некроза. Путь клеточной гибели при открытии МРТ-поры зависит от исходного энергетического статуса клетки, поскольку помимо проапоптотических факторов процесс образования апоптосом требует наличия АТФ в клетке. Кроме того, открытие МРТ-поры вызывает дополнительный выход Ca^{2+} в саркоплазму уже перегруженных кальцием кардиомиоцитов, что усиливает контрактуру [90].

Ингибирование открытия МРТ-поры с помощью циклоспорина А ограничивает размер инфаркта, что впервые было показано W. Nazareth и соавт. в 1991 г [Nazareth, W. et al., 1991]. Ограничение ишемического-реперфузионного повреждении при таких воздействиях как ишемическое, фармакологическое пре- и посткондиционирование, адаптация к гипоксии, связано с ингибированием открытия МРТ-поры [121]. В 2000 г. E.J. Griffiths и соавт. [29] в опытах на изолированных кардиомиоцитах показали, что циклоспорин А (CsA), ингибитор МРТ-поры, в концентрации 1 μM защищает клетки от действия гипоксии и реоксигенации. Выживаемость клеток, в среду инкубации которых был добавлен циклоспорин, оказалась в 3 раза выше, чем без применения этого препарата. При этом $[Ca^{2+}]_i$ в митохондриях выживших кардиомиоцитах была выше в клетках, инкубированных с циклоспорином. Эти факты говорят о негативной роли открытия МРТ-поры в формировании ишемического-реперфузионного повреждения.

Свободнорадикальное окисление и генерация активных форм кислорода. В данный момент принято считать, что активные формы кислорода являются внутриклеточными сигнальными молекулами [3]. Основным источниками АФК в клетке являются дыхательная цепь митохондрий [3]. В физиологических условиях 1-2% молекул кислорода превращаются в супероксидный анион-радикал ($O_2^{\bullet}$) [15]. Семейство ферментов супероксиддисмутаз, которые имеют в своем активном центре ионы меди, магния или никеля, превращают $O_2^{\bullet}$ в перекись водорода [3]. Следом за этим каталаза или глутатионпероксидаза катализируют превращение H_2O_2 в воду [3].

Продукция АФК во время ишемии происходит, несмотря на низкое содержание кислорода [99, 109]. При этом, как ни парадоксально, наибольшее содержание АФК наблюдается в миокарде при длительной (более 30 мин) ишемии [109]. Дело в том, что даже при длительной и глубокой ишемии уровень кислорода в миокарде никогда не падает ниже 4 мм рт. ст. В 1997 г T.L. Vanden Hoek и соавт. [109] провели показательный эксперимент: с помощью «ловушек» кислорода (система аскорбат 200 мкМ + аскорбат оксидаза 1 U/мл или дитионит натрия 10 мМ) его содержание в суспензии изолированных кардиомиоцитов было снижено до 2,5 мм рт. ст. Оказалось, что такое воздействие улучшает выживаемость клеток и постишемическое восстановление сократимости, а образование АФК было снижено в 1,8–2 раза, что бесспорно свидетельствует о важной роли АФК, генерируемых во время ишемии, в патогенезе ишемического-реперфузионного повреждения сердца. Наибольшего значения уровень АФК достигает в период реперфузии, когда восстанавливается процесс аэробного дыхания митохондрий и дыхательная цепь митохондрий генерируют такое количество $O_2^{\bullet}$, которое способно вызвать повреждение кардиомиоцитов [61].

Активные формы кислорода могут образовываться в различных участках электроннотранспортной цепи митохондрий, в том числе в комплексе I [56] и в комплексе III [33]. В ряде работ [17, 56] показано, что ингибирование электроннотранспортной цепи in vitro ротеноном или амобарбиталом приводит к снижению выработки АФК и значительному уменьшению ишемических и реперфузионных повреждений миокарда. Общеизвестно, что ротенон и амобарбитал блокируют передачу электронов с комплекса I на коэнзим Q. Это свидетельствует о важной роли комплекса II или III в продукции АФК дыхательной цепью в патогенезе ишемических-реперфузионных повреждений. Недавними исследованиями показана важная роль повреждения цитохрома ***c*** в выработке АФК [83]. В физиологических условиях окисленный цитохром ***c*** выступает в качестве альтернативного акцептора $O_2^{\bullet}$, который генерируется в дыхательной цепи убисемихиноном. Во время ишемии поврежденный цитохром ***c***, находясь в

восстановленном состоянии, не способен акцептировать увеличенное количество $O_2^{\bullet-}$. В этом случае супероксиддисмутаза катализирует дисмутацию $O_2^{\bullet}$ в кислород и H_2O_2. Этому факту соответствует повышенное во время ишемии количества H_2O_2, которое может быть скорректировано введением экзогенного цитохрома ***c*** [83].

Перекись водорода обладает токсичным действием, поскольку окисляет сульфгидрильные и метильные группы белков [15]. Кроме того, при взаимодействии H_2O_2 с металлами, обладающими переменной валентностью, образуется гидроксильный радикал ($OH^{\bullet}$), сильный окислитель, запускающий процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах кардиомиоцитов [13]. Свободные радикалы ($O_2^{\bullet}$ и $OH^{\bullet}$) – молекулы с высокой реакционной способностью, содержащие непарный электрон, наличие которого обусловливает выраженную способность вызывать неспецифическое повреждение почти всех компонентов клетки. Особенно подвержены такому повреждению полиненасыщенные жирные кислоты, что способствует активации ПОЛ, значительно изменяющему свойства мембран [13].

В пользу участия АФК в патогенезе ишемического-реперфузионного повреждения миокарда и аритмогенеза говорят следующие факты: показано, что ловушки свободных радикалов (scavenger), в частности, мелатонин и имитатор супероксиддисмутазы темпол снижают частоту возникновения и тяжесть реперфузионных аритмий [114], а применение антиоксидантов оказывает кардиопротекторный эффект при коронарооккклюзии [59].

Механизмы патогенного влияния АФК при ишемии-реперфузии многочисленны. Так, например, установлена чувствительность к активным формам кислорода МРТ-поры, открытие которой происходит при реперфузионном повреждении [61]. Важным фактором патогенеза ишемических и реперфузионных повреждений сердца является индукция перекисного окисления липидов активными формами кислорода [5].

3. Патофизиологические последствия ионного дисбаланса и гиперпродукции АФК

Накопление избыточного количества Ca^{2+} в саркоплазме во время ишемии и гиперпродукция АФК приводят к нескольким неблагоприятным для клетки последствиям: активации Ca^{2+}-зависимых ферментов (нуклеаз, фосфолипаз и протеаз), возникновению контрактуры и нарушению ритма сердца [12, 18, 50]. Повышение продукции активных форм кислорода приводит к активации металлопротеиназ, окислению кардиолипина и индукции апоптоза [34, 110].

Активация фосфолипаз А-типа ионами кальция приводит к повреждению сарколеммы и ядерной мембраны кардиомиоцитов (в частности, разрушаются основные фосфолипиды мембран – фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин), что ведет к гибели кардиомиоцита по пути некроза [68]. Важная роль ионов кальция в активации фосфолипаз класса А показана K. Takahashi и соавт. [104], которые в 1983 г обнаружили, что ингибирование Ca^{2+}-каналов нифедипином приводит к увеличению устойчивости сарколеммы к действию ишемии, при этом не наблюдается типичного для ишемии снижения содержания фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в составе мембран. Позднее в ряде исследований была подтверждена важная роль фосфолипаз в патогенезе ишемического и реперфузионного повреждения сердца [18, 46]. В 1989 г M.B. Katsuoka и соавт. [46] на модели ишемии-реперфузии изолированного сердца крысы обнаружили кардиопротекторный эффект ряда соединений, обладающих ингибиторной активностью в отношении фосфолипазы A_2. Важная роль в повреждении кардиомиоцитов при ишемии отводится Ca^{2+}-активируемой фосфолипазе $iPLA_2$, способность которой транслоцироваться в сарколемму или ядерную мембрану и разрушать фосфолипиды показана даже во время короткого (5 мин) периода ишемии [68]. Кроме того, обнаружено, что под действием $iPLA_2$ происходит высвобождение арахидоновой кислоты, дальнейший метаболизм которой липоксигеназой, циклооксигеназой и цитохромом Р-450 приводит к образованию лейкотриенов, простаноидов, эпоксиэйкозатриеновой и гидроксиэйкозатетраеновой кислот, принимающих участие в инициировании воспалительной реакции при ишемии-реперфузии миокарда [58].

Помимо фосфолипаз класса А, ионами кальция может быть активирована и фосфолипаза С [11]. Обнаружено, что активация пула фосфолипаз С происходит при ишемии и показана ее важная роль в возникновении ишемических и реперфузионных аритмий [35]. Кроме того, ингибирование фосфолипазы С препаратом U-73122 во время ишемии приводит к улучшению сократительной способности реперфузируемого миокарда [11]. Эти факты указывают на значительный вклад активации фосфолипазы С в патогенезе ишемического-реперфузионного повреждения кардиомиоцитов.

Активация протеаз. Повышение $[Ca^{2+}]_i$ в саркоплазме приводит к активации саркоплазматических протеаз, в частности калпаина (Ca^{2+}-зависимая цистеин-протеаза) [94]. Ишемия-реперфузия индуцируют повышение внутриклеточного содержания калпаина [94]. Кроме ионов Ca^{2+} калпаин может быть активирован проапоптотическим белком BID. Роль калпаинов в формировании ишемических-реперфузионных повреждений показана многочисленными исследованиями, в которых ингибиторы этого семейства протеаз оказывают выраженный кардиопротекторный эффект [41, 117]

Мишенью для протеаз во время ишемии становятся такие жизненно-важные для кардиомиоцита белки, как сарколеммальная Na^+/K^+-АТФаза [98], SERCA2 и рианодиновые рецепторы СПР [84], фосфоламбан [97], белки цитоскелета [82]. Калпаин участвует в регуляции апоптоза: расщепляет неактивную форму проапоптотическиого белка Bid, что приводит к образованию активной формы [16], инактивирует антиапоптотический белок Bcl-xL [75], участвует в проапоптотическом каскаде, инициированном TNFα (tumor necrosis factor α, фактор некроза опухолей). Таким образом, активация калпаина приводит к нарушению работы ионных насосов, усугублению ионного дисбаланса, активации проапоптотических белков и разрушению цитоскелета, что приводит к потере целостности сарколеммы и гибели кардиомиоцита по пути некроза или апоптоза.

Активация металлопротеиназ. Во время реперфузии происходит деэнергизация митохондрий и образо-

вание большого количества активных форм кислорода, в том числе пероксинитрита ($ONOO^-$) [116] который стимулирует активацию металлопротеиназы MMP-2, содержащей в активном центре Zn^{2+} [110]. Обнаружено, что металлопротеиназы локализованы в кардиомиоцитах около саркомеров, тропонина I, легких цепей миозина и α-актина [95, 112]. Ингибирование металлопротеиназы-2 блокаторами TIMP-2, доксициклином или о-фенантролином предупреждает повреждение тропонина I, легких цепей миозина, снижает освобождение маркера повреждения кардиомиоцитов – креатинфосфокиназы и улучшает сократительную функцию миокарда при ишемии-реперфузии [95, 112]. Эти факты говорят о важной роли металлопротеиназ в ишемическом-реперфузионном повреждении миокарда.

С активацией металлопротеиназ, по-видимому, связаны и некоторые сигнальные пути индукции апоптоза: обнаружено, что металлопротеиназа-2 вовлечена в TNFα-зависимый путь апоптоза [96], осуществляет протеолитическую активацию GSK-3β [45], что может способствовать открытию MPT-поры.

Активация поли(АДФ-рибозо)-полимеразы (PARP). Поли(АДФ-рибозо)- полимераза – фермент, связывающийся с ДНК и относящийся к группе поли(АДФ-рибозо)-трансфераз, в физиологических условиях его функция – катализировать синтез поли-АДФ-рибозы, который предшествует репарации ДНК при повреждении нитей ДНК. Кроме того, PARP катализирует поли-АДФ-рибозилирование белков, связанных с ДНК (гистоны и ламин В) [80]. Донором АДФ-рибозы является NAD. Рибозилирование гистонов и ламина В ферментом PARP обеспечивает отделение этих белков от ДНК и делает разрыв в ДНК доступным для ферментов репаративного синтеза ДНК [80]. Апоптотическая гибель клетки сопровождается расщеплением PARP каспазами [80]. Казалось бы, PARP играет исключительно протекторную роль в ишемическом и реперфузионном повреждении сердца. Однако на практике дело обстоит прямо противоположным образом. В условиях ишемии и постишемического восстановления, когда происходит значительное повреждение нитей ДНК, этот фермент может усугублять уже имеющиеся повреждения. В 2000 г A.A. Pieper и соавт. [86] показали увеличение активности PARP в миокарде при ишемии (in vitro), а так же способность ингибитора PARP 4-аминобензамида уменьшать размер зоны ишемического некроза на 50% и улучшать постишемическое восстановление сократимости миокарда. Авторы предположили, что благотворный эффект ингибирования PARP реализуется за счет увеличения NAD. В другом исследовании, у «нокаутированных» по гену PARP мышах обнаружено значительное уменьшение ишемического-реперфузионного некроза по сравнению с обычными особями [123]. Возможно, что PARP, удаляя из нитей хроматина гистоны , тем самым делает ДНК более доступной для эндонуклеазы G, участвующей в апоптозе. Эти факты свидетельствуют о важной роли PARP в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений сердца.

У мышей, «нокаутированных» по гену PARP-1 (PARP-1-/-), снижена индуцированная ишемией активация фактора апоптоза AP-1 (activator protein-1), увеличена активность белка HSF-1 и усилена экспрессия белка HSP70, который также как и HSF-1 обеспечивает повышение толерантности кардиомиоцитов к действию ишемии-реперфузии [124]. Эти же авторы показали, что у мышей PARP-1-/- нарушен механизм ишемической активации каспаз 1 и 3, а также увеличена экспрессия антиапоптотического белка Bcl-2 [122].

Таким образом, ишемическое снижение поступления кислорода и элиминации продуктов обмена, в совокупности с последующей реоксигенацией, влекут за собой нарушения метаболизма жирных кислот и ионного баланса, гиперпродукцию АФК, накопление в цитоплазме кардиомиоцитов ионов Ca^{2+} с последующей активацией протеаз, металлопротеаз, фосфолипаз $iPLA_2$ и С, нуклеаз и поли(АДФ-рибозо)-полимеразы, что обеспечивает гибель кардиомиоцитов, возникновение реперфузионной эндотелиальной дисфункции, воспалительного ответа и нарушения ритма сердца.

Работа подготовлена при поддержке государственных контрактов: № 02.740.11.0714, контракт № 11.519.11.2016, № 11.519.11.2028, грантов РФФИ: 10-04-00288, 11-04-00467, 11-04-98001, 11-04-98000, 11-04-98004, 12-04-91152.

Литература

1. *Горбунов А.С., Маслов Л.Н., Ласукова Т.В., Лишманов Ю.Б.* Кардиопротекторный, инотропный и хронотропный эффекты ишемического посткондиционирования на модели изолированного сердца крысы // Сиб. мед. жур. (Томск). – 2011. – Т. 26, № 3, Вып. 1. – С. 25–29.

2. *Гарганеева А.А., Округин С.А., Зяблов Ю.И.* Программа ВОЗ «Регистр острого инфаркта миокарда»: 25-летнее эпидемиологическое изучение инфаркта миокарда в среднеурбанизированном городе Западной Сибири // Сиб. мед. жур. (Томск). – 2010. – Т. 25, № 2, Вып. 1. С. 44–48.

3. *Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б.* Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. – М.: МАИК «Наука / Интерпериодика», 2001.

4. *Маслов Л. Н.* Новые подходы к профилактике и терапии ишемических и реперфузионных повреждений сердца при остром инфаркте миокарда // Сиб. мед. жур. (Томск). – 2010. – Т. 25, № 2. – С. 17–24.

5. *Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др.* Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. – М.: Слово, 2006.

6. *Нейлер В.Г., Дейли М.Дж.* Кальций и повреждение кардиомиоцитов. Глава 18. В кн. Физиология и патофизиология сердца: в 2 т., т.1: пер с англ / Под ред. Н. Сперелакиса.- 2-е изд., испр. – М.: Медицина, 1990. – С. 556–578.

7. *Сперелакис Н.* Электрические характеристики клеток в покое и поддержание распределения ионов. Глава 3. В кн. Физиология и патофизиология сердца: в 2 т., т. 1: пер с англ / Под ред. Н. Сперелакиса.- 2-е изд., испр. – М.: Медицина, 1990. – С. 90–127.

8. *Сперелакис Н.* Медленный потенциал действия и свойства медленных каналов миокардиальных клеток. Глава 8. В кн. Физиология и патофизиология сердца: в 2 т., т.1: пер с англ / Под ред. Н. Сперелакиса. 2-е изд., испр. – М. Медицина. – 1990. – С. 241–277.

9. *Шипулин В.М., Козлов Б.Н., Евтушенко А.В. и др.* Современные стратегии лечения сердечной недостаточности в кардиохирургии // Сиб. мед. жур. (Томск). – 2010. – Т. 25, № 2, Вып. 2. – С. 4–12.

10. *Arai M., Lefer D.J., So T. et al.* An anti-CD18 antibody limits infarct size and preserves left ventricular function in dogs with ischemia and 48-hour reperfusion // J. Am. Coll. Cardiol. – 1996. – Vol. 27. – P. 1278-1285.

11. *Asemu G., Dhalla N.S., Tappia P.S.* Inhibition of PLC improves postischemic recovery in isolated rat heart // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2004. – Vol. 287, № 6. – P. H2598–H2605.

12. *Atsma D.E., Bastiaanse E.M., Jerzewski A. et al.* Role of calcium-activated neutral protease (calpain) in cell death in cultured neonatal rat cardiomyocytes during metabolic inhibition // Circ. Res. – 1995. – Vol. 76, № 6. – P. 1071–1078.

13. *Bolli R.* Oxygen-derived free radicals and myocardial reperfusion injury. an overview // Cardiovasc. Drugs Ther. – 1991. – Vol. 5, Suppl. 2. – P. 249–268.

14. *Butler T.L., Egan J.R., Graf F.G. et al.* Dysfunction induced by ischemia versus edema. does edema matter? // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 2009. – Vol. 138, № 1. – P. 141–147.

15. *Chance B., Sies H., Boveris A.* Hydroperoxide metabolism in mammalian organs // Physiological Reviews. – 1979. – Vol. 59. – P. 527–605.

16. *Chen M., He H., Zhan S. et al.* Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – P. 30724–30728.

17. *Chen Q., Camara A.K., Stowe D.F. et al.* Modulation of electron transport protects cardiac mitochondria and decreases myocardial injury during ischemia and reperfusion // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2007. – Vol. 292. – P. 137–147.

18. *Chien K.R., Willerson J.T., Buja L.M.* Phospholipid alterations and membrane injury during myocardial ischemia // Adv. Myocardiol. – 1985. – Vol. 5. – P. 347–353.

19. *Cohen M. V., Yang X. M., Downey J.M.* The pH hypothesis of postconditioning. staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis // Circulation. – 2007. – Vol. 115, № 14. – P. 1895–1903.

20. *Dauber I.M., Lesnefsky E.J., VanBenthuysen K.M. et al.* Reactive oxygen metabolite scavengers decrease functional coronary microvascular injury due to ischemia-reperfusion // Am. J. Physiol. – 1991. – Vol. 260, № 1, Pt 2. – P. H42-H49.

21. *Monte F., Lebeche D., Guerrero J.L. et al.* Abrogation of ventricular arrhythmias in a model of ischemia and reperfusion by targeting myocardial calcium cycling // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2004. – Vol. 101. – P. 5622–5627.

22. *Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S., Reed J. C.* X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases // Nature. – 1997. – Vol. 388, № 6639. – P. 300–304.

23. *Dosenko V.E., Nagibin V.S., Tumanovska L.V., Moibenko A.A.* Protective effect of autophagy in anoxia-reoxygenation of isolated cardiomyocyte? // Autophagy. – 2006. – Vol. 2. – P. 305–306.

24. *Faxon D.P., Gibbons R.J., Chronos N.A. et al.* The effect of blockade of the CD11/CD18 integrin receptor on infarct size in patients with acute myocardial infarction treated with direct angioplasty. the results of the HALT-MI study // J. Am. Coll. Cardiol. –2002. – Vol. 40. – P. 1199–1204.

25. *Festjens, N. Vanden Berghe T., Vandenabeele P.* Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise. signalling cascades, important mediators and concomitant immune response // Biochim. Biophys. Acta. – 2006. – Vol. 1757. – P. 1371–1387.

26. *Gillette P.C., Pinsky W.W., Lewis R.M. et al.* Myocardial depression after elective ischemic arrest. Subcellular biochemistry and prevention // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. –1979. – Vol. 77, № 4. – P. 608–18.

27. *Golstein P., Kroemer G.* Cell death by necrosis. towards a molecular definition // Trends Biochem. Sci. – 2007. – Vol. 32. – P. 37–43.

28. *Griffiths E.J., Ocampo C.J., Savage J.S. et al.* Mitochondrial calcium transporting pathways during hypoxia and reoxygenation in single rat cardiomyocytes // Cardiovasc. Res. – 1998. – Vol. 39. – P. 423–433.

29. *Griffiths E.J., Ocampo C.J., Savage J.S. et al.* Protective effects of low and high doses of cyclosporin A against reoxygenation injury in isolated rat cardiomyocytes are associated with differential effects on mitochondrial calcium levels // Cell Calcium. – 2000. – Vol. 27. – P. 87–95.

30. *Gritsenko E.N., Kutyshenko V.P., Saris N.E., et al.* [Purification of the mitochondrial calcium uniporter from the beef heart and characterization of its properties] // Biofizika. – 2010. – Vol. 55, № 5. – P. 803–808.

31. *Gunter T.E., Pfeiffer D.R.* Mechanisms by which mitochondria transport calcium // Am. J. Physiol. – 1990. – Vol. 258. – P. C755–C786.

32. *Gustafsson A.B., Gottlieb R.A.* Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. Am. J. Physiol // Cell Physiol. – 2007. – Vol. 292, № 1. – P. C45–C51.

33. *Guzy R.D., Schumacker P.T.* Oxygen sensing by mitochondria at complex III. the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia // Exp. Physiol. – 2006. – Vol. 91. – P. 807–819.

34. *Halestrap A.P.* A pore way to die. the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection // Biochem. Soc. Trans. – 2010. – Vol. 38. – P. 841–860.

35. *Hayashi H., Miyata H., Terada H. et al.* Effects of phospholipase C on action potentials and intracellular Ca^{2+} concentration in guinea pig heart // Jpn. Circ. J. – 1993. – Vol. 57, № 4. – P. 344–352.

36. *Hedström E., Aström-Olsson K., Ohlin A.K. et al.* Initial results of inflammatory response, matrix remodeling, and reactive oxygen species following PCI in acute ischemic myocardial injury in man // J. Invasive. Cardiol. – 2011. – Vol. 23, № 9. – P. 371–376.

37. *Hochhauser E., Kivity S., Offen D. et al.* Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2003. – Vol. 284. – P. H2351–H2359.

38. *Horwitz L.D., Kaufman D., Keller M.W., Kong Y.* Time course of coronary endothelial healing after injury due to ischemia and reperfusion // Circulation. – 1994. – Vol. 90, № 5. – P. 2439–2447.

39. *Hoyer-Hansen M., Bastholm L., Szyniarowski P. et al.* Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2 // Mol. Cell. – 2007. – Vol. 25. – P. 193–205.

40. *Imahashi K., Schneider M. D., Steenbergen C., Murphy E.* Transgenic expression of Bcl-2 modulates energy metabolism, prevents cytosolic acidification during ischemia, and reduces ischemia/reperfusion injury // Circ. Res. – 2004. – Vol. 95. – P. 734–741.

41. *Iwamoto H., Miura T., Okamura T. et al.* Calpain inhibitor-1 reduces infarct size and DNA fragmentation of myocardium in ischemic/reperfused rat heart // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 1999. – Vol. 33, № 4. – P. 580–586.

42. *Jeremias I., Kupatt C., Villalba-Martin A. et al.* Involvement of CD95/Apo1/Fas in cell death after myocardial ischemia // Circulation. – 2000. – Vol. 102. – P. 915–920.

43. *Kajstura J.W., Cheng W., Reiss K. et al.* Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats // Lab. Invest. – 1996. – Vol. 79. – P. 949–956.

44. *Kanamori H., Takemura G., Goto K. et al.* Autophagy limits acute myocardial infarction induced by permanent coronary artery occlusion // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2011. – Vol. 300, № 6. – P. H2261–H2271.

45. *Kandasamy A.D., Schulz R.* Glycogen synthase kinase-3b is activated by matrix metalloproteinase-2 mediated proteolysis in cardiomyoblasts // Cardiovasc. Res. – 2009. – Vol. 83. – P. 698–706.

46. *Katsuoka M., Ohnishi S.T.* Pharmacologic protection of perfused rat heart against global ischemia // Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. – 1989. – Vol. 38, № 3. – P. 151–156.

47. *Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R.* Apoptosis. a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics // Br. J. Cancer. – 1972. – Vol. 26. – P. 239–257.

48. *Kihara Y., Morgan J.P.* Intracellular calcium and ventricular fibrillation. Studies in the aequorinloaded isovolumic ferret heart // Circ. Res. – 1991. – Vol. 68. – P. 1378–1389.

49. *Kim S.J., Kuklov A., Crystal G.J.* In vivo gene delivery of XIAP protects against myocardial apoptosis and infarction following ischemia/reperfusion in conscious rabbits // Life Sci. – 2011. – Vol. 88, № 13–14. – P. 572–577.

50. *Kleber G.* The potential role of Ca^{2+} for electrical cell-to-cell uncoupling and conduction block in myocardial tissue // Basic Res Cardiol. – 1992. – Vol. 87, Suppl 2. – P. 131–143.

51. *Kloner R.A., Alker K.J.* The effect of streptokinase on intramyocardial hemorrhage, infarct size, and the no-reflow phenomenon during coronary reperfusion // Circulation. – 1984. – Vol. 70, № 3. – P. 513–521.

52. *Kloner R.A., Ganote C.E., Jennings R.B.* The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog // J. Clin. Invest. – 1974. – Vol. 54, № 6. – P. 1496–1508.

53. *Krauskopf A., Eriksson O., Craigen W. J. et al.* Properties of the permeability transition in VDAC1(-/-) mitochondria // Biochim. Biophys. Acta. – 2006. – Vol. 1757, № 5–6. – P. 590–595.

54. *Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C.* Mitochondrial membrane permeabilization in cell death // Physiol. Rev. – 2007. – Vol. 87, № 1. – P. 99–163.

55. *Lakatta E.G., Guarnieri T.* Spontaneous myocardial calcium oscillations. are they linked to ventricular fibrillation? // J. Cardiovasc. Electrophysiol. – 1993. – Vol. 4. – P. 473–489.

56. *Lambert A., Brand M.D.* Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH. ubiquinone oxidoreductase (complex I) // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279. – P. 39414–39420.

57. *Lee G.J., Chae S.J., Jeong J.H. et al.* Characterization of mitochondria isolated from normal and ischemic hearts in rats utilizing atomic force microscopy // Micron. – 2011. – Vol. 42, № 3. – P. 299–304.

58. *Levick S.P., Loch D.C., Taylor S.M., Janicki J.S.* Arachidonic acid metabolism as a potential mediator of cardiac fibrosis associated with inflammation // J. Immunol. – 2007. – Vol. 178. – P. 641–646.

59. *Levraut J., Iwase H., Shao Z.H. et al.* Cell death during ischemia. relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2003. – Vol. 284, № 2. – P. H549–H558.

60. *Li L.Y., Luo X., Wang X.* Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria // Nature. – 2001. – Vol. 412. – P. 95–99.

61. *Loor G., Kondapalli J., Iwase H. et al.* Mitochondrial oxidant stress triggers cell death in simulated ischemia-reperfusion // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – Vol. 1813, № 7. – P. 1382–1394.

62. *Loos B., Genade S., Ellis B. et al.* At the core of survival. autophagy delays the onset of both apoptotic and necrotic cell death in a model of ischemic cell injury // Exp. Cell. Res. – 2011. – Vol. 317, № 10. – P. 1437–1453.

63. *Lopaschuk G.D., Ussher J.R., Folmes C.D. et al.* Myocardial fatty acid metabolism in health and disease // Physiol. Rev. – 2010. – V. 90, № 1. – P. 207–258.

64. *Lovell J.F., Billen L.P., Bindner S. et al.* Membrane binding membrane permeabilization by Bax // Cell. – 2008. – Vol. 135. – P. 1074–1084.

65. *Mace P.D., Riedl S.J.* Molecular cell death platforms and assemblies // Curr. Opin. Cell. Biol. – 2010. – Vol. 22, № 6. – P. 828–836.

66. *Marchant D.J., Boyd J.H., Lin D.C. et al.* Inflammation in myocardial diseases // Circ. Res. – 2012. – Vol. 110, № 1. – P. 126–144.

67. *Matsui Y., Takagi H., Qu X. et al.* Distinct role of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion. roles of AMPK and Beclin 1 in mediating autophagy // Circ. Res. – 2007. – Vol. 100. – P. 914–922.

68. *McHowat, J., Liu S., Creer M. H.* Selective hydrolysis of plasmalogen phospholipids by Ca^{2+}-independent PLA2 in hypoxic ventricular myocytes // Am. J. Physiol. – 1998. – Vol. 274. – P. C1727–C1737.

69. *Mizushima N., Yamamoto A., Hatano M. et al.* Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells // J. Cell Biol. – 2001. – Vol. 152. – P. 657–668.

70. *Movassagh M., Foo R. S.* Simplified apoptotic cascades // Heart Fail Rev. – 2008. – Vol. 13, № 2. – P. 111–119.

71. *Murata M., Akao M., O'Rourke B., Marban E.* Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca(2+) overload during simulated ischemia and reperfusion. possible mechanism of cardioprotection // Circ. Res. – 2001. – Vol. 89. – P. 891–898.

72. *Murphy E., Cross H., Steenbergen C.* Sodium regulation during ischemia versus reperfusion and its role in injury // Circ. Res. – 1999. – Vol. 84. – P. 1469-–1470.

73. *Musiał K., Zwolińska D.* Matrix metalloproteinases and soluble Fas/FasL system as novel regulators of apoptosis in children and young adults on chronic dialysis // Apoptosis. – 2011. – Vol. 16, № 7. – P. 653–659.

74. *Nagata S., Golstein P.* The Fas death factor // Science. – 1995. – Vol. 267, № 5203. – P. 1449-1456.

75. *Nakagawa T., Yuan, J.* Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis // J. Cell. Biol. – 2000. – Vol. 150. – P. 887–894.

76. *Namekata I., Shimada H., Kawanishi T. et al.* Reduction by SEA0400 of myocardial ischemia-induced cytoplasmic and mitochondrial Ca^{2+} overload // Eur. J. Pharmacol. – 2006. – Vol. 543. – P. 108–115.

77. *Nazareth W., Yafei N., Crompton M.* Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin-A // J. Mol. Cell. Cardiol. – 1991. – Vol. 23. – P. 1351–1354.

78. *Neely J. R., Feuvray D.* Metabolic products and myocardial ischemia // Am. J. Pathol. – 1981. – Vol. 102. – P. 282–291.

79. *Okabe E., Fujimaki R., Murayama M., Ito H.* Possible mechanism responsible for mechanical dysfunction of ischemic myocardium. a role of oxygen free radicals // Jpn. Circ. J. – 1989. – Vol. 53, № 9. P. 1132–1137.

80. *Oliver F J., Menissier-de Murcia J., de Murcia G.* Poly(ADP-ribose)polymerase in the cellular response to DNA damage, apoptosis and disease // Am. J. Hum. Genet. – 1999. – Vol. 64, № 5. – P. 1282–1288.

81. *Ostadal B., Kolar F.* Cardiac Ischemia. From Injury to Protection. Boston, Dordrecht, London. Kluwer Academic Publishers, 1999. 173 p.

82. *Papp Z., van der Velden J., Stienen G. J.* Calpain-I induced alterations in the cytoskeletal structure and impaired mechanical properties of single myocytes of rat heart // Cardiovasc. Res. – 2000. – Vol. 45, № 4. – P. 981–993.

83. *Pasdois P., Parker J. E., Griffiths E. J., Halestrap A. P.* The role of oxidized cytochrome c in regulating mitochondrial reactive oxygen species production and its perturbation in ischaemia // Biochemistry Journal. – 2011. – Vol. 436. – P. 493–505.

84. *Pedrozo Z., Sánchez G., Torrealba N. et al.* Calpains and proteasomes mediate degradation of ryanodine receptors in a model of cardiac ischemic reperfusion // Biochim. Biophys. Acta. – 2010. – Vol. 1802, № 3. – P. 356–262.

85. *Peng C.F., Murphy M.L., Kane J.J., Straub K.D.* Alteration in calcium metabolism in mitochondria isolated from ischemic and reperfused myocardium // Recent Adv. Stud. Cardiac Struct. Metab. – 1976. – Vol. 11. – P. 533–538.

86. *Pieper A.A., Walles T., Wei G. et al.* Myocardial postischemic injury is reduced by polyADPripose polymerase-1 gene disruption // Mol. Med. – 2000. – Vol. 6, № 4. – P. 271–282.

87. *Ravingerova T., Tribulova N., Slazak J., Curtis M.J.* Brief, intermediate and prolonged ischemia in the isolated crystalloid perfused rat heart. relationship between susceptibility to arrhythmias and degree of ultrastructural injury // J. Mol. Cell. Cardiol. – 1995. – Vol. 27. – P. 1937–1951.

88. *Robergs R.A., Ghiasvand F., Parker D.* Biochemistry of exerciseinduced metabolic acidosis // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2004. – Vol. 287. – P. R502–R516.

89. *Rockenfeller P., Ring J., Muschett V. et al.* Fatty acids trigger mitochondrion-dependent necrosis // Cell Cycle. – 2010. – Vol. 9, № 14. – P. 2836–2842.

90. *Ruiz-Meana M., Abellán A., Miró-Casas E., Garcia-Dorado D.* Opening of mitochondrial permeability transition pore induces hypercontracture in Ca^{2+} overloaded cardiac myocytes // Basic Res. Cardiol. – 2007. – Vol. 102, № 6. – P. 542–552.

91. *Ruiz-Meana M., Garcia-Dorado D., Miro-Casas E. et al.* Mitochondrial Ca^{2+} uptake during simulated ischemia does not affect permeability transition pore opening upon simulated reperfusion // Cardiovasc. Res. – 2006. – Vol. 71. – P. 715–724.

92. *Russell D.C., Lawrie J.S., Riemersma R.A., Oliver M.F.* Mechanisms of phase 1a and 1b early ventricular arrhythmias during acute myocardial ischemia in the dog // Am. J. Cardiol. – 1984. – Vol. 53, № 2. – P. 307–312.

93. *Sánchez J.A., Rodríguez-Sinovas A., Fernández-Sanz C. et al.* Effects of a reduction in the number of gap junction channels or in their conductance on ischemia-reperfusion arrhythmias in isolated mouse hearts // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2011. – V. 301, № 6. – P. H2442-H2453.

94. *Sandmann S., Spormann J., Prenzel F. et al.* Calcium channel blockade limits transcriptional, translational and functional up-regulation of the cardiac calpain system after myocardial infarction // Eur. J. Pharmacol. – 2002. – Vol. 453, № 1. – P. 99-109.

95. *Sawicki G., Leon H., Sawicka J. et al.* Degradation of myosin light chain in isolated rat hearts subjected to ischemia-reperfusion injury. a new intracellular target for matrix metalloproteinase-2 // Circulation. – 2005. – Vol. 112. – P. 544–552.

96. *Shen J., O'Brien D., Xu Y.* Matrix metalloproteinase-2 contributes to tumor necrosis factor alpha induced apoptosis in cultured rat cardiac myocytes // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2006. – Vol. 347. – P. 1011–1020.

97. *Shintani-Ishida K., Yoshida K.* Ischemia induces phospholamban dephosphorylation via activation of calcineurin, PKC-α, and protein phosphatase 1, thereby inducing calcium overload in reperfusion // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – Vol. 1812, № 7. – P. 743–751.

98. *Singh R.B., Dhalla N.S.* Ischemia-reperfusion-induced changes in sarcolemmal Na^+/K^+-ATPase are due to the activation of calpain in the heart // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 2010. – Vol. 88, № 3. – P. 388–397.

99. *Stewart S., Lesnefsky E.J., Chen Q.* Reversible blockade of electron transport with amobarbital at the onset of reperfusion attenuates cardiac injury // Transl. Res. – 2009. – Vol. 153, № 5. – P. 224–231.

100. *Sybers H.D., Ingwall J., DeLuca M.* Autophagy in cardiac myocytes // Recent Adv. Stud. Cardiac. Struct. Metab. – 1976. – Vol. 12. – P. 453–463.

101. *Szabó I., Zoratti M.* The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. I. Binary structure and voltage dependence of the pore // FEBS Lett. – 1993. – Vol. 330, № 2. – P. 201–205.

102. *Szarzoi O., Asemu G., Ostadal B., Kolar F.* The role of reactive oxygen species and nitric oxide in ischemia/reperfusion injury of chronically hypoxic rat heart // Eur. J. Heart. Failure. Suppl. – 2003. – Vol. 2, № 1. – P. 53.

103. *Takagi H., Matsui Y., Sadoshima J.* The role of autophagy in mediating cell survival and death during ischemia and reperfusion in the heart. Antioxid.Redox // Signal. – 2007. – Vol. 9. – P. 1373–1382.

104. *Takahashi K., Kako K. J.* The effect of a calcium channel antagonist, Nisoldipine, on the ischemia-induced change of canine sarcolemmal membrane // Basic. Res. Cardiol. – 1983. – Vol. 78, № 3. – P. 326–237.

105. *Takeo S., Tanonaka K.* Na^+ overload-induced mitochondrial damage in the ischemic heart // Can J Physiol Pharmacol. – 2004. – Vol. 82, № 12. – P. 1033–1043.

106. *Tavernarakis N.* Cardiomyocyte necrosis. alternative mechanisms, effective interventions // Biochim. Biophys. Acta. – 2007. – Vol. 1773. – P. 480–482.

107. *Tsao P. S., Aoki N., Lefer D.J. et al.* Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the cat // Circulation. – 1990. – Vol. 82, № 4. – P. 1402–1412.

108. *VanBenthuysen K.M., McMurtry I.F., Horwitz L.D.* Reperfusion after acute coronary occlusion in dogs impairs endothelium-dependent relaxation to acetylcholine and augments contractile reactivity in vitro // J. Clin. Invest. – 1987. – Vol. 79, № 1. – P. 265–274.

109. *Vanden Hoeneß T.L., Li C. et al.* Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to reperfusion // J. Mo. Cell. Cardiol. – 1997. – Vol. 29, № 9. – P. 2571–2583.

110. *Viappiani S., Nicolescu A.C., Holt A. et al.* Activation and modulation of 72 kDa matrix metalloproteinase-2 by peroxynitrite and glutathione // Biochem Pharmacol. – 2009. – Vol. 77. – P. 826–834.

111. *Vrbjar N., Dzurba A., Ziegelhöffer A.* Influence of global ischemia on the sarcolemmal ATPases in the rat heart // Mol. Cell. Biochem. – 1995. – Vol. 147, № 1–2. – P. 99-103.

112. *Wang W., Schulze C. J., Suarez-Pinzon W. L. et al.* Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury // Circulation. – 2002. – Vol. 106. – P. 1543–1549.

113. *Williams I.A., Xiao X.H., Ju Y.K., Allen D.G.* The rise of $[Na(^+)]_{(i)}$ during ischemia and reperfusion in the rat heart-underlying mechanisms // Pflugers Arch. – 2007. – Vol. 454, № 6. – P. 903–912.

114. *Yang L., Korge P., Weiss J.N., Qu Z.* Mitochondrial oscillations and waves in cardiac myocytes: insights from computational models // Biophys. J. – 2010. – Vol. 98, № 8. – P. 1428–1438.

115. *Yaniv G., Shilkrut M., Lotan R. et al.* Hypoxia predisposes neonatal rat ventricular myocytes to apoptosis induced by activation of the Fas (CD95/Apo-1) receptor. Fas activation and apoptosis in hypoxic myocytes // Cardiovasc Res. – 2002. – Vol. 54, № 3. – P. 611–623.

116. *Yasmin W., Strynadka K.D., Schulz R.* Generation of peroxynitrite contributes to ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts // Cardiovasc. Res. – 1997. – Vol. 33. – P. 422–432.

117. *Yoshikawa Y., Zhang G.X., Obata K. et al.* Cardioprotective effects of a novel calpain inhibitor SNJ-1945 for reperfusion injury after cardioplegic cardiac arrest // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2010. – Vol. 298, № 2. – P. H643-H651.

118. *Yui H., Imaizumi U., Beppu H. et al.* Comparative effects of verapamil, nicardipine, and nitroglycerin on myocardial ischemia/reperfusion injury // Anesthesiol Res Pract. – 2011. – P. 521084.

119. *Zaugg C.E., Wu S.T., Lee R.J. et al.* Importance of calcium for the vulnerability to ventricular fibrillation detected by premature ventricular stimulation. Single pulse versus sequential pulse methods // J. Mol. Cell. Cardiol. – 1996. – Vol. 28. – P. 1059-1072.

120. *Zhang N., Zhu B.* The role of the rat sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase promoter in myocardial ischemia-preconditioning // Mol. Cell. Biochem. – 2010. – Vol. 333, № 1–2. – P. 311–321.

121. *Zhu W.-Zh., Xie Y., Chen L. et al.* Intermittent high altitude hypoxia inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores against reperfusion injury // Journal of Molecular and Cellular Cardiology. – 2006. – Vol. 40. – P. 96–106.

122. *Zingarelli B., Hake P. W., O'Connor M. et al.* Absence of poly(ADP-ribose)polymerase-1 alters nuclear factor-kappa B activation and gene expression of apoptosis regulators after reperfusion injury // Mol. Med. – 2003. – Vol. 9, № 5–8. – P. 143–153.

123. *Zingarelli B., Salzman A. L., Szabó C.* Genetic disruption of poly (ADP-ribose) synthetase inhibits the expression of P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia/reperfusion injury // Circ. Res. – 1998. – Vol. 83, № 1. – P. 85–94.

124. *Zingarelli B., Hake P.W., O'Connor M. et al.* Differential regulation of activator protein-1 and heat shock factor-1 in myocardial ischemia and reperfusion injury. role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2004. – Vol. 286. – P. H1408-H1415.

125. *Zucchi R., Ronca F., Ronca-Testoni S.* Modulation of sarcoplasmic reticulum function. a new strategy in cardioprotection? // Pharmacol. Ther. – 2001. – Vol. 89. – P. 47–65.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ БОЛЬНЫХ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ И КОМОРБИДНОСТЯМИ

И.Р. Минуллина, Р.И. Дмитриева, С.В. Анисимов, А.А. Билибина, О.В. Тарасова, М.В. Пузанов, С.Н. Козлова, Ю.В. Сазонова, Д.В. Моторин, В.В. Стругов, А.А. Костарева, А.Ю. Зарицкий, Е.В. Шляхто

Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

Минуллина Изида Ренатовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-исследовательской группы клеточной биологии; *Дмитриева Рената Игоревна* – кандидат биологических наук, заведующая группой клеточной биологии; *Анисимов Сергей Владимирович* – доктор медицинских наук, заведующий научно-исследовательской группой генно-клеточной инженерии и БиоБанком; *Билибина Анна Александровна* – эмбриолог клиники передовых репродуктивных технологий; *Тарасова Ольга Владимировна* – кандидат биологических наук, эмбриолог клиники передовых репродуктивных технологий; *Пузанов Максим Викторович* – младший научный сотрудник научно-исследовательской группы генно-клеточной инженерии; *Козлова Светлана Николаевна* – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий; *Сазонова Юлия Вячеславовна* – врач-кардиолог 2-го кардиологического отделения; *Моторин Дмитрий Васильевич* – кандидат медицинских наук, врач-гематолог отделения гематологии; *Стругов Владимир Владимирович* – врач-гематолог отделения гематологии; *Костарева Анна Александровна* – кандидат медицинских наук, руководитель Института молекулярной биологии и генетики; *Зарицкий Андрей Юрьевич* – доктор медицинских наук, профессор, руководитель Института гематологии; *Шляхто Евгений Владимирович* – доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН, директор ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» Минздрава России.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. E-mail: nil.sk09@gmail.com (Минуллина Изида Ренатовна).

Резюме.

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) представляют собой ценный ресурс клеточной терапии сердечной недостаточности и иных заболеваний. В нашем исследовании, мы оценили функциональные свойства МСК подкожной жировой ткани больных ХСН, в том числе в сочетании с коморбидностями (ожирением и/или сахарным диабетом), в сравнении со здоровыми взрослыми донорами. В частности, исследовалась пролиферативная активность клеток, их пластичность, уровень экспрессии ими ключевых секреторных факторов вовлеченных в регуляцию ангиогенеза (VEGF, HGF, ангиопоэтин-2, TGFβ1) и воспаления (IL6, MCP1), и собственно секреции этих факторов.

Ключевые слова: Мезенхимные стволовые клетки, жировая ткань, пролиферативная активность, пластичность, секреторные факторы.

FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF FAT TISSUE -DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS IN THE PATIENTS WITH HEART FAILURE AND CO-MORBIDITIES

I.R. Minullina, R.I. Dmitrieva, S.V. Anisimov, A.A. Bilibina, O.V. Tarasova, M.V. Puzanov, S.N. Kozlova, Yu.V. Sazonova, D.V. Motorin, V.V. Strugov, A.A. Kostareva, A.Yu. Zaritskey, E.V. Shlyakhto

Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia.

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail.: nil.sk09@gmail.com (Izida R. Minullina – senior Research Scientist, Scientific Research Group of Cell Biology).

Abstract.

Mesenchymal stem cells (MSC) represent a valuable substrate of cell therapy for heart failure and other disorders. In our study, we have investigated the functional properties of MSC derived from the subcutaneous adipose tissue of the patients suffering chronic heart failure, also with comorbidities (obesity and/or diabetes mellitus), in comparison with healthy adult donors. In particular, we have evaluated proliferative activity and plasticity of the cells, levels of expression of key secreted factors involved in the regulation of angiogenesis (VEGF, HGF, angiopoetin-2, TGFβ1) and inflammation (IL6, MCP1) and actual secretion of those factors.

Key words: Mesenchymal stem cells, adipose tissue, proliferation, plasticity, secreted factors.

Статья поступила в редакцию 02.09.2012, принята к печати 10.09.2012.

Введение

Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) является осложнением многих заболеваний сердечно-сосудистой системы, в первую очередь таких, как гипертоническая болезнь, ишемическая болезнь, заболевания клапанного аппарата сердца, кардиомиопатии [1]. ХСН лидирует по заболеваемости и смертности в индустриально развитых странах; в терминальной стадии ХСН смертность этих больных выше, чем при многих злокачественных заболеваниях [2]. По данным отечественных авторов, смертность больных в России составляет до 33 % ежегодно [3]. Известно, что коморбидности не только усложняют терапию основного заболевания, но и определяют ухудшение прогноза ХСН [4,5], однако механизмы этого процесса остаются малоизученными.

Стволовые и прогениторные клетки выполняют in vivo важнейшие биологические функции, определяя ход процессов роста, развития, адаптации и регенерации [6]. При этом нарушение функциональных свойств циркулирующих и резидентных прогениторных и стволовых клеток, развивающееся в результате генетических, метаболических и иных нарушений определяет задержку роста и развития, снижение адаптивного и регенеративного потенциала организма [7,8]. Наиболее обширными нишами стволовых клеток взрослого организма являются красный костный мозг и жировая ткань. При этом мезенхимные (мезенхимальные) стволовые клетки (МСК) входящие в состав этих тканей выполняют широкий спектр функций, обеспечивая трофику и поддержку по отношению к иным типам клеток, синтезируя и секретируя факторы роста и компоненты сигнальных каскадов, и обладая высоким уровнем пластичности [9,10]. Применение МСК не связано с этическими трудностями [11], а сами клетки считаются практически нетуморогенными [12], что выгодно отличает МСК от некоторых других видов стволовых клеток.

Ранее нами было показано, что на ранних пассажах МСК костного мозга и жировой ткани практически не различаются по таким характеристикам, как скорость пролиферации, клоногенность и дифференцировочный потенциал. Мы также продемонстрировали, что МСК жировой ткани гораздо меньше подвержены репликативному старению, по сравнению с МСК костного мозга [13].

Отсюда, МСК жировой ткани (МСК ЖТ) представляют собой ценный субстрат клеточной терапии многих заболеваний, являющийся альтернативой традиционно используемым МСК костного мозга (МСК КМ). При этом МСК ЖТ доступны, и не требуют проведения высокоинвазивных вмешательств, связанных с забором клеточного материала (аспирации костного мозга), или фармакологических воздействий (мобилизация костного мозга), – чреватых риском развития значимых осложнений. МСК ЖТ демонстрируют как сходство, так и различие с МСК КМ по отдельным параметрам функциональных свойств [14], и сравнительное их изучение представляет собой интереснейшую научную задачу. Оценка функциональных свойств популяций МСК различных тканей (включая костный мозг и жировую ткань) в различных условиях (в том числе патологических) является объектом направленных исследований, проводимых многими исследовательскими группами [15, 16]. В частности, такие исследования активно проводятся в интересах разработки новых методов лечения, диагностики, мониторинга и прогностики сердечно-сосудистых, эндокринных и гематологических заболеваний [17–19]. В нашей работе впервые было исследовано влияние на свойства МСК жировой ткани (МСК ЖТ) сердечной недостаточности и коморбидностей (ожирение и сахарный диабет), при этом была проведена комплексная оценка пролиферативной активности, пластичности и секреторной функции этих клеток.

Методы

Участники исследования

Участниками исследования (общее число которых составило 42 человека) являлись 6 здоровых взрослых доноров (Д) и 36 пациентов страдающих сердечной недостаточностью, в том числе 11 пациентов изолированной сердечной недостаточностью (СН), 16 сердечной недостаточностью в сочетании с ожирением (СН+О), и 9 сердечной недостаточностью, ожирением и сахарным диабетом 2 типа (СН+О+СД). Критериями включения для больных являлись: 1) хроническая сердечная недостаточность II–IV функционального класса; 2) наличие кардиальной дисфункции, доказывающей сердечную недостаточность (присутствие хотя бы 1 из нижеперечисленных признаков: фракция выброса ≤40%, размер левого предсердия >4 см, NT-proBNP >400 пг/мл (>47,3 пМ/л), или BNP>150 пг/мл [20]. Исследование проводилось в соответствии со стандартами Хельсинской Декларации (1989), всеми пациентами было подписано информированное согласие. Демографические, клинические и лабораторные данные участников исследования приведены в табл. 1.

Таблица 1

Демографические, клинические и лабораторные данные участников исследования

	Д	СН	СН+О	СН+О+СД
Возраст	43,0 ± 6,6	57,5 ± 8,5	46,4 ± 5,5	48,1 ± 9,7
Мужчины, %	20,0	90,9	81,0	66,7
ИМТ, кг/м^2	25,2 ± 3,4	24,7 ± 3,2	36,0 ± 6,3	35,4 ± 5,6
Окружность талии, см	Не изм-сь	88,3 ± 14,5	110,6 ± 11,9	110,3 ± 11,8
Содержание жира, г	Не изм-сь	29,0 ± 6,76	36,8 ± 3,9	36,5 ± 7,3
Глюкоза, ммоль/л	Не изм-сь	5,3 ± 0,4	5,5 ± 0,4	6,6 ± 2,4
HbA1c, %	Не изм-сь	5,7 ± 0,5	5,4 ± 0,7	6,4 ± 0,3
Фруктозамин, мкмоль/л	235,7 ± 20,3	244,9 ± 20,7	236,6 ± 23,6	267,9 ± 64,6
Инсулин, пмоль/л	66,6 ± 48,4	82,8 ± 35,8	82,8 ± 30,5	77,6 ± 29,5
Холестерин, ммоль/л	5,4 ± 1,2	5,1 ± 1,2	4,7 ± 1,2	4,3 ± 0,6
ЛНП, ммоль/л	2,7 ± 0,9	3,3 ± 1,0	2,6 ± 0,8	2,3 ± 0,7
Триглицериды, ммоль/л	1,6 ± 1,0	1,6 ± 0,6	1,9 ± 1,0	1,9 ± 1,1
Лептин, нг/мл	16,4 ± 11,9	16,4 ± 13,0	37,2 ± 25,8*‡	26,2 ± 23,3
Адипонектин, мкг/мл	6,9 ± 3,2	10,9 ± 6,4	8,8 ± 6,1	7,0 ± 6,0
NTproBNP, пмоль/л	0,0	66,2 ± 55,3**	60,6 ± 60,1**	52,6 ± 68,6*
proANP, нмоль/л	1,1 ± 0,7	6,8 ± 3,3**	6,2 ± 3,0**	4,6 ± 4,3*

Приведены средние значения показателей и стандартное отклонение: * p<0,05; ** p<0,01 по сравнению со здоровыми донорами ‡ p<0,01 по сравнению с группой СН.

Клинико-лабораторное обследование

Клиническое обследование включало в себя получение информации о жалобах и по анамнезу пациента, а также физикальное обследование. Лабораторное обследование включало в себя, в частности, биохимический анализ крови (глюкоза, инсулин, гликозилированный гемоглобин, фруктозамин), измерение уровня циркулирующих адипокинов (лептин, адипонектин) в крови и определение NTproBNP и proANP. Биохимические исследования выполнялись при помощи анализаторов Abbot Architect 8000 (США) и Elecsys (Roche, Швейцария), а также с использованием ИФА наборов производства Biomedika (Австрия), DBC (Канада) и BioVendor (Чехия).

Процедура забора образца подкожной жировой ткани

Аспирацию подкожной жировой ткани проводили в асептическом боксе под местной анестезией из левой околопупочной области, путем однократной пункции толстой иглой (19G); общий объем аспирата подкожной жировой ткани составлял 0,3-0,5 мл. Образцы транспортировались в лабораторию на +4°С, выделение клеток начиналось в течение 2 часов после забора.

Первичные культуры МСК ЖТ

Образец аспирата подкожной жировой ткани отмывали от видимых сгустков крови, стерильным сбалансированном солевым раствором Хенкса (HBSS, Биолот, Россия), и механически диссоциировали. Энзиматическую диссоциацию проводили с использованием стерильного 5 мг/мл раствора коллагеназы III (Worthington, США) на стерильном HBSS в течение 20–30 мин. После нейтрализации коллагеназы 10% эмбриональной телячьей сывороткой, клетки высаживали на культуральные флаконы, и культивировали в стандартных условиях (CO_2 5%, 37 °С) в питательной среде α-МЕМ (ПанЭко, Россия), содержащей 10,0% оптимизированной для МСК эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 1,0% смеси антибиотиков (пенициллин/стрептомицин) и 2 мМ L-глутамина (Invitrogen, США). Неадгезивные клетки отмывали через 48 часов; пассажи МСК ЖТ проводили по достижению субконфлюентности, с использованием 0,25% раствора трипсина-ЭДТА (Invitrogen).

Анализ пролиферативной активности МСК ЖТ

Для оценки пролиферативной активности МСК использовали расчет времени удвоения популяции клеток. Для этого проводили подсчет общего количества МСК ЖТ в культуре на каждом пассаже; время удвоения популяции МСК рассчитывают, используя следующую формулу: Тудв = (T2-T1) / [(Log10N2 – Log10N1) × 3,32], где N2 – количество собранных клеток, а N1 – количество посаженных клеток, а (T2-T1) – время между пассажами.

Анализ пластичности МСК ЖТ

Количественный анализ пластичности МСК проводился путем направленной дифференцировки клеток in vitro в дефолтных направлениях: остеогенном и адипогенном. МСК ЖТ высаживали на 24-луночные планшеты в количестве 40 тыс. клеток на лунку и культивировали стандартной среде в течение 24 часов. После этого питательную среду заменяли на среду, содержащую индукторы дифференцировки:для остеогенного направления: 1 мкМ дексаметазона; 0,2 мМ аскорбиновой кислоты; 1 мМ β-глицеролфосфата (все от Sigma, США, для адипогенного направления: 1 мкМ инсулина, 1 мкМ дексаметазона (Sigma) и 0,5 мкМ 3-изобутил-1-метилксантина (Sigma). Клетки культивировали в присутствии индукторов дифференцировки в течение 21 дня (остеогенная дифференцировка) или 14 дней (адипогенная дифференцировка) полную смену питательной среды проводили каждые 3-4 дня. Результаты дифференцировки оценивали окрашиванием культуры производных МСК красителем Alizarin R (Roth, Германия, остеогенная дифференцировка) и Oil Red O (Bio-Optica, Италия; адипогенная дифференцировка). Количественная оценка пластичности образцов МСК проводилась после обработки снимков полученных препаратов в специальном приложении программы AxioVision для обработки и анализа окрашенных изображений.

Анализ экспрессии генов

Тотальную РНК выделяли из МСК ЖТ на 2-3 пассажах при помощи наборов Aurum Total RNA mini-kit (Bio-Rad, США), концентрацию и качество РНК измеряли на спектрофотометре ND-1000 (Thermo Scientific, США). кДНК синтезировали из 1 мкг тотальной РНК при помощи набора RevertAid cDNA First Strand Synthesis kit (Fermentas, Латвия). Уровень экспрессии в МСК ЖТ генов, кодирующих ключевые секреторные факторы, вовлеченные в регуляцию ангиогенеза (VEGF, HGF, ангиопоэтин-2, TGFβ1) и воспаления (IL6, MCP1) проводили при помощи метода ПЦР в реальном времени на программируемом амплификаторе 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, США). Для постановки реакций использовали наборы для определения уровня экспрессии конкретных генов от Applied Biosystems.

Анализ секреторной активности МСК ЖТ

Питательные среды кондиционировали на МСК ЖТ в течение 48 часов. Исследование секреции перечисленных выше факторов, а также лептина, адипонектина, IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, Basic FGF, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, IP-10, MIP-1α, MIP-1β, PDGF-BB, RANTES и TNF-α производили методами мультиплексного анализа и сэндвич-ИФА с использованием наборов Bio-Plex Pro human cytokine 27-plex immunoassay (BioRad, США) и DuoSet ELISA Development kit (R&D, США) согласно протоколам производителя.

Статистический анализ

Достоверность различий между группами оценивалась при помощи t-критерия Стьюдента, с использованием программного обеспечения Prism 5 (GraphPad Software, США).

Результаты и обсуждение

Характеристика групп участников исследования

Всего в данное в исследование было включено 42 человека, из которых 6 являлись здоровыми взрослыми донорами (Д), 11 пациентами страдающими изолированной сердечной недостаточностью (СН), 16 сердечной недостаточностью в сочетании с ожирением (СН + О), и 9 сердечной недостаточностью, ожирением и сахарным диабетом 2 типа (СН + О + СД). Все участники исследования (включая здоровых доноров) проходили клинико-лабораторное обследование, в том числе им выполнялись биохимический анализ крови (глюкоза, инсулин, гликозилированный гемоглобин, фруктозамин), измерение уровня циркулирующих адипокинов (лептин, адипонектин) в крови и определение NTproBNP и proANP. Демографические, клинические и лабораторные данные участников исследования приведены в Таблице 1. У всех больных СН, но не у здоровых доноров, наблюдалось значимое повышение уровня NTproBNP и proANP, подтверждающее тяжесть основного заболевания (рис. 1). Все больные СД получали специфическую терапию, и показатели углеводного обмена (глюкоза, инсулин, гликозилированный гемоглобин, фруктозамин) не отличались значимо от значений в группах лиц, не страдающих СД, подтверждая, таким образом, компенсацию СД в соответствующей группе. Исследование параметров тяжести ожирения (содержание жира в граммах, окружность в талии) подтвердил правильность разделения участников по группам (СН и СН + О), проведенное по индексу массы тела (ИМТ) (см. табл. 1). Таким образом, качественный состав групп участников исследования является адекватным. Исследование уровня циркулирующих адипокинов (лептин, адипонектин) сыворотки крови выявило у страдающим ожирением больных повышение уровня лептина и тенденцию к понижению уровня адипонектина, по сравнению с больными изолированной СН (см. рис. 1; табл. 1). Известно, что повышение уровня лептина в сыворотке и плазме крови наблюдается у лиц с избыточным весом [21]. Наоборот, уровень адипонектина понижен у больных ожирением и СД [22, 23]. Выявленные изменения уровней циркулирующих адипокинов (лептин, адипонектин) сыворотки крови при ожирении являются ожидаемыми, и соответствуют литературным данным. В то же время, анализ результатов исследования параметров липидного обмена (общий холестерин, ЛНП, триглицериды) не выявил значимых различий между группами (см. табл. 1).

Анализ пролиферативной активности и пластичности МСК ЖТ

У всех участников исследования были взяты образцы аспирата подкожной жировой ткани, которые были успешно использованы для получения (установления) индивидуальных первичных культур МСК ЖТ. Анализ времени удвоения культуры, являющийся ключевым параметром оценки пролиферативной активности клеток, выявил тенденцию к замедлению клеточного деления в группах больных (Д < СН < СН + О < СН + О + СД), которая, однако, не была статистически достоверной (рис. 2). Ранее было установлено, что пролиферативная активность разных типов клеток снижается при определенных заболеваниях (в том числе при СН и СД) [24]. В том числе, это установлено для МСК костного мозга мыши [25] и человека (статья готовится к печати), и эта

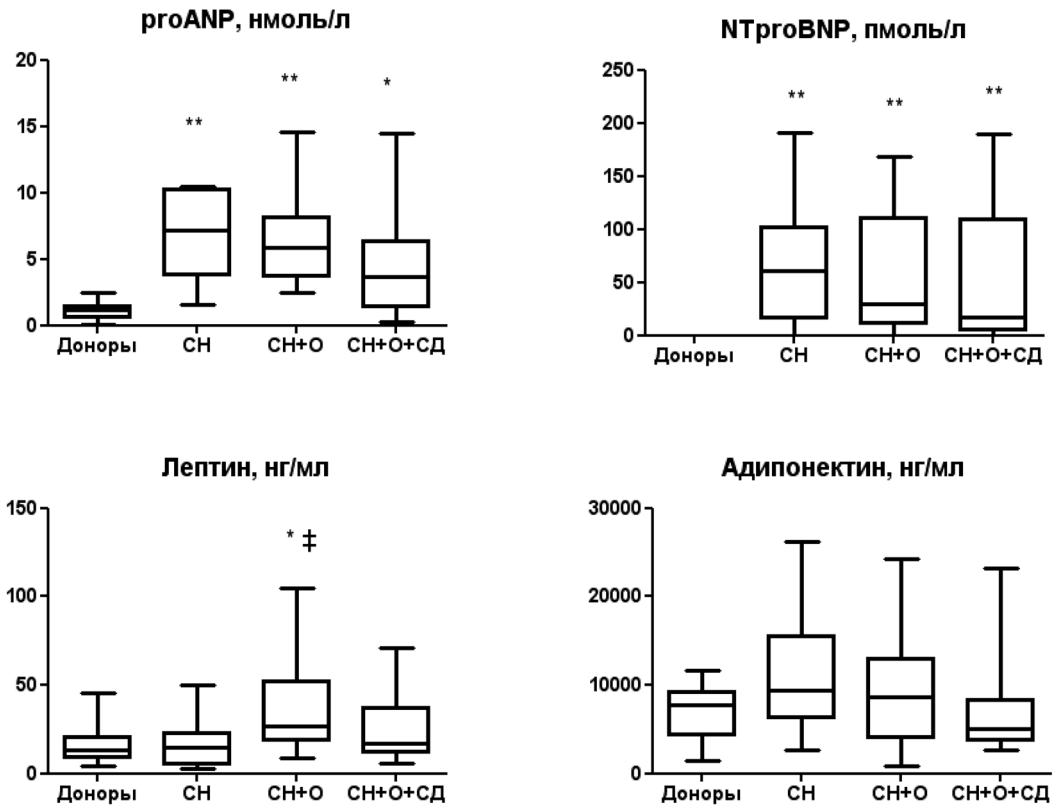


Рис. 1. Показатели NTproBNP, proANP, лептина и адипонектина в сыворотке крови больных СН и здоровых доноров

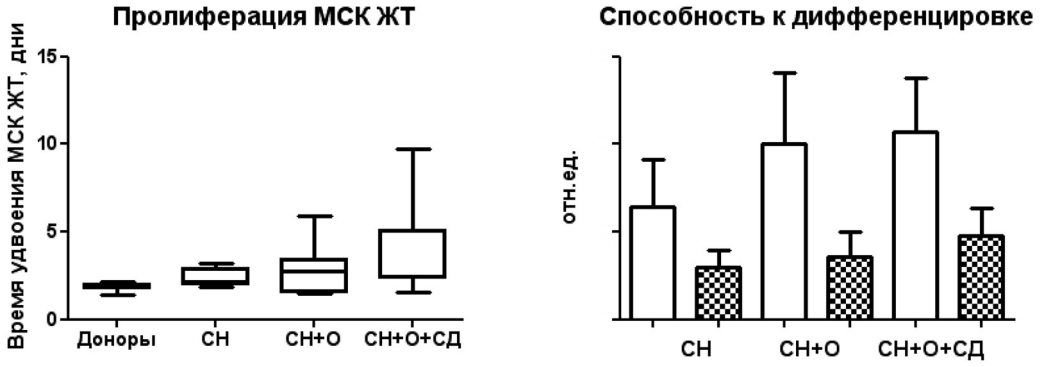


Рис. 2. Пролиферативная активность и способность к дифференцировке МСК ЖТ

закономерность была подтверждена в нашем исследовании. Исследование пластичности МСК ЖТ подтвердило мультипотентность клеток, которые могли быть эффективно дифференцированы в адипогенном и остеогенном направлениях, являющихся дефолтными для МСК. Известно, что при ожирении клетки жировой ткани существуют *in vivo* в состоянии гипоксии. При моделировании состояния гипоксии *in vitro*, отмечается повышение пластичности МСК, в том числе способности клеток дифференцировать а адипогенном и остеогенном направлениях [26]. В нашем исследовании различий в уровне пластичности клеток в группах участников исследования выявлено не было (см. рис. 2, табл. 2), хотя выявлялась тенденция к повышению способности МСК ЖТ к дифференцировке в остеогенном направлении в группах больных с ожирением (СН + О и СН + О + СД). Выявленная разница в уровне пластичности клеток в группах не была, однако, статистически достоверной, – возможно из-за недостаточного объема экспериментальных и контрольной групп.

Таблица 2

Показатели пластичности клеток в группах участников исследования.

	СН	СН + О	СН + О +С Д
Остеогенный потенциал, отн.ед.	25,7 ± 10,9	40,1 ± 16,2	42,8 ± 12,2
Адипогенный потенциал, отн.ед.	11,9 ± 3,8	14,3 ± 5,6	19,0 ± 6,3

Анализ экспрессии генов и секреторной активности МСК ЖТ

Изменения уровня экспрессии генов могут происходить в результате широкого ряда факторов, и не всегда полностью отражают изменения уровня синтеза и секреции кодируемых ими белков. В данном исследовании мы анализировали уровень секреции факторов, вовлеченных в регуляцию ангиогенеза и воспаления, а для тех факторов, концентрация которых в кондиционированной среде была измеримой ((IL6, VEGF, MCP1, TGFβ1, HGF)) также оценивали уровень экспрессии, кодирующих их генов. Ангиопоэтин-2, лептин, адипонектин, IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, bFGF, эотаксин, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, IP-10, MIP-1α, MIP-1β, PDGF-BB, RANTES, TNF-α, не определялись в исследованных образцах на секреторном уровне, и для них анализ экспрессии генов не проводился.

В ходе анализа полученных в этой серии экспериментов данных были выявлены как разнонаправленные, так и однонаправленные изменения на транскрипционном и секреторном уровнях. Так, для IL6 и VEGF было выявлено достоверное повышение уровня экспрессии генов в группе СН + О + СД (по сравнению со здоровыми донорами), которое, однако, не сопровождалось повышением уровня секреции белков IL6 и VEGF, соответственно рис. 3; табл. 3 и 4). Для HGF была выявлена тенденция к повышению уровня экспрессии гена и секреции белка

Таблица 3

Показатели экспрессии генов-мишеней в группах участников исследования

	СН	СН+О	СН+О+СД
IL-6	1,041 (0,08, 2,00)	1,105 (0,15, 2,06)	2,919 (0,48, 5,36) *
VEGF	1,170 (0,69, 1,65)	1,024 (0,63, 1,42)	1,740 (1,08, 2,40) *
HGF	1,596 (0,001, 3,48)	2,259 (0,001, 4,90)	1,425 (0,001, 3,06)
MCP-1	0,337 (0,001, 0,69)	0,496 (0,02, 0,97)	0,626 (0,001, 1,29)
TGFβ1	1,232 (0,95, 1,47)	1,334 (1,07, 1,59)	1,298 (1,03, 1,56)

Приведены средние значения экспрессии, нормализованные к показателям группы доноров (значение 1,000); в скобках указан 95% доверительный интервал. *p < 0,05 по сравнению со здоровыми донорами.

Таблица 4

Показатели секреции белков-мишеней в группах участников исследования

	Д	СН	СН+О	СН+О+СД
IL6	1004,0 ± 548,3	549,8 ± 551,0	1304,0 ± 909,1	856,4 ± 288,5
VEGF	1197 ± 255,7	689,4 ± 204,3	948,5 ± 331,5	732,1 ± 107,7
HGF	120,7 ± 72,0	84,1 ± 94,9	312,0 ± 373,5	73,9 ± 44,1
MCP1	440,9 ± 105,4	312,4 ± 157,9	505,9 ± 305,0	473,3 ± 208,4
TGFβ1	901,9 ± 70,3	841,1 ± 153,1	963,3 ± 218,3	868,7 ± 141,8

Приведены средние значения показателей секреции белков-мишеней, и стандартное отклонение. Все значения даны в пг/мл.

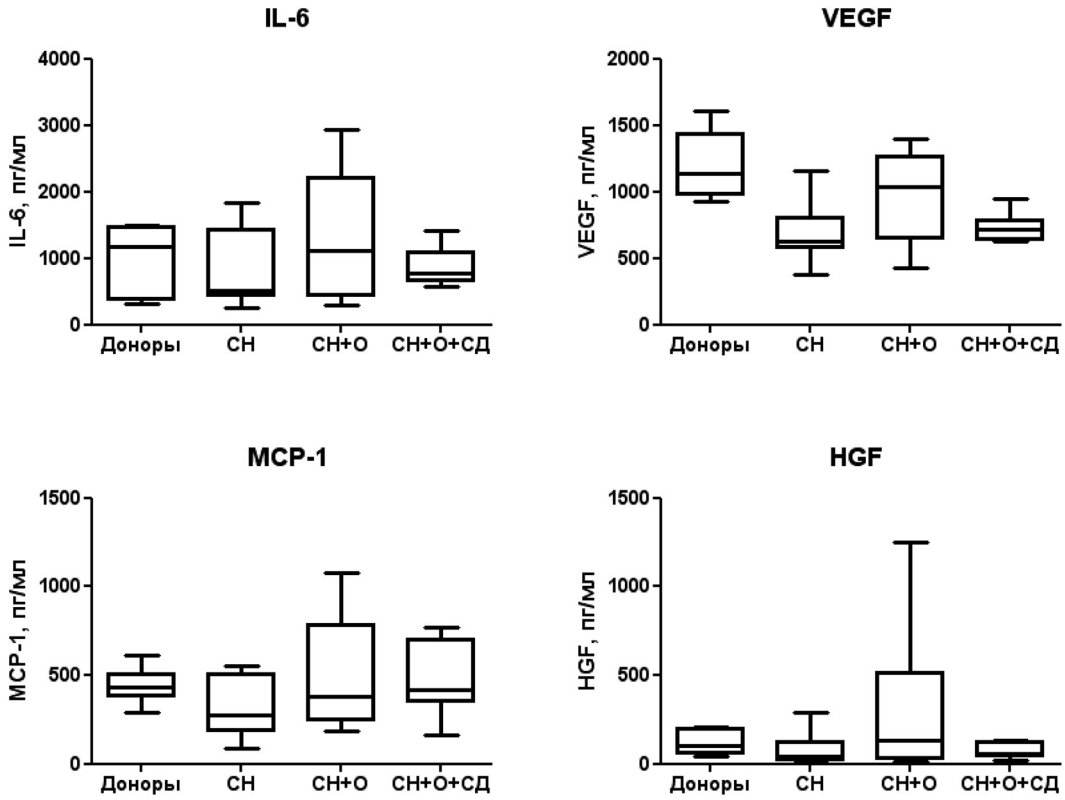


Рис. 3. Концентрация цитокинов в кондиционированной среде МСК ЖТ:
*p < 0,05; **p < 0,01 по сравнению со здоровыми донорами; ‡ p < 0,01 по сравнению с группой СН.

(в группе СН+О), однако и в этом случае наблюдаемые различия между группами не были статистически достоверны. Для MCP1 была выявлена тенденция к снижению как уровня экспрессии генов, так и секреции белков (наиболее заметная в группе СН), однако наблюдаемые различия между группами не были статистически достоверны. Наконец, для TGFβ1 не было обнаружено различий между группами как в отношении экспрессии гена, так и для секреции белка (табл. 3 и 4).

Повышение уровня многих цитокинов наблюдается при СН (VEGF, HGF, bFGF, PDGF-BB [27]; IL6 и MCP1 [28]), а также при ожирении (IL6 [22,29-31]; HGF [32]; MCP1 [33]) и СД (VEGF [31]). В исследованиях *in vitro* было также показано, что высокий уровень глюкозы при культивировании клеток приводит к увеличению экспрессии IL6 и MCP1 (в моноцитах человека) [34], экспрессии VEGF-A и ангиопоэтина-1 (в МСК КМ мышей) [25], синтеза и секреции VEGF-A (в гладкомышечных клетках крыс) [35]. Однако в литературе практически не обнаруживается данных о том, как вышеперечисленные заболевания влияют на свойства МСК (в т.ч. МСК ЖТ) человека, в т.ч. на их секреторную активность. Вместе с тем, в настоящее время считается, что паракринная функция МСК является наиболее важной для реализации их терапевтического потенциала при трансплантации по поводу СН. Являющиеся субстратом трансплантации МСК не дифференцируют в функциональные кардиомиоциты *in vivo*, а оказывают местное трофическое действие, – в частности, эффективно стимулируя жизнеспособность и сократимость кардиомиоцитов, способствуя неоваскуляризации и ремоделированию [36]. В соответствие с этим, в нашем исследовании, мы выбрали в качестве мишеней именно секреторные факторы.

Восстановление поврежденных в результате ИМ тканей включает следующие стадии: 1) апоптоз и некроз клеток; 2) воспаление с направленной миграцией клеток в участок повреждения; 3) фиброз и последующее формирование рубцовой ткани; 4) регенерацию за счет образования новой функциональной ткани [37]. Все исследованные нами цитокины задействованы в той или иной стадии процесса репарации.

Интерлейкин-6 (IL6) считается плейотропным цитокином, регулирующим многие клеточные функции, включая гуморальный и клеточный ответ, и играет центральную роль в реакциях воспаления и повреждения тканей [38]. Интересно, что повышение уровня IL6 в плазме крови предшествует развитию инфаркта миокарда [39] и СД2, и этот показатель расценивается как ранний независимый предиктор СН [40] и ИМ [41]. Эндотелиальный сосудистый фактор роста (VEGF) является необходимым для поддержания нормальной эндотелиальной сосудистой функции: пролиферации, миграции, проницаемости эндотелиальных клеток, синтеза и секреции ими оксида азота (NO). Кроме того, действие VEGF опосредует антиапоптотические свойства эндотелиальных клеток [42]. HGF обладает митогенной и анти-апоптотической активностью в отношении разных типов клеток. Способствуя ангиогенезу и подавляя апоптоз, HGF может играть важную роль в кардиопротекции, а также в регенерации эндотелиальных клеток и кардиомиоцитов после ИМ. Поскольку сывороточная концентрация HGF повышается на ранних стадиях ИМ и при СН, этот фактор роста может также служить прогностическим и диагностичес-

ким маркером сердечно-сосудистых заболеваний [43]. Основной известной функцией MCP1 является контроль перехода моноцитов из сосудистого русла в ткани, хемотаксиса, трансформации их в тканевые макрофаги [44]. Повышение MCP1 коррелирует с функциональным классом СН [28]. Функцией TGFβ1 является контроль фибротических изменений в клетках, включающих фибробласты сердечной мышцы [45]. TGFβ1 стимулирует синтез коллагена и подавляет его деградацию, изменяет баланс между матриксными металлопротеиназами (MMP) и их тканевыми ингибиторами (TIMP) [46].

Важнейшей целью наших исследований являлось охарактеризование транскрипционного и постранскрипционного уровней секретируемых клетками цитокинов. В ходе сравнительного исследования экспрессии генов, кодирующих перечисленных выше факторы в МСК ЖТ больных СН и коморбидностями, и собственно секреторной функции клеток, было, в частности, выявлено повышение уровня экспрессии IL6 и VEGF в МСК ЖТ больных страдающих СД, которое не проявлялось на секреторном уровне. Напротив, у МСК больных СД способность секретировать IL6, VEGF и IL6 и HGF скорее была снижена (на уровне тенденции). Кроме того, отмечалась тенденция к снижению MCP1 на уровне РНК и секретируемого белка в группе СН и тенденция к повышению экспрессии и секреции HGF в группе СН+О (рис. 3).

IL6 может оказывать как протективное, так и повреждающее действие на ткани [38,47], регулируя процессы апоптоза, воспаления, ремоделирования и ангиогенеза. Спрогнозировать эффект введения МСК ЖТ с измененным уровнем экспрессии или секреции IL6 больным СН в настоящее время невозможно, и выявленная тенденция требует дальнейшего изучения. Аналогично, в настоящее время остается неизвестным, может ли быть реализован физиологически эффект повышения уровня экспрессии VEGF в МСК ЖТ у больных СН в виде усиления ангиогенеза. Одного этого фактора может быть недостаточно для стимуляции ангиогенеза у больных СД, поскольку гипергликемия негативно отражается на клетках-мишенях VEGF. Например, было показано, что у больных СД моноциты, для которых, как и для клеток эндотелия, характерен специфичный ответ на VEGF, становятся резистентными к дальнейшему стимулирующему действию данного ростового фактора вследствие неспецифической активации внутриклеточных сигнальных путей [48]. Более того, в нашем исследовании повышенная экспрессия VEGF на уровне РНК не реализовывалась на уровне секреции. Разнонаправленность изменений IL6 и VEGF на транскрипционном и секреционном уровнях позволяет предположить пост-транскрипционную регуляцию данных цитокинов.

Наряду с VEGF, bFGF (FGF2) и ангиопоэтинами, HGF известен как важный фактор, участвующий в ангиогенезе [36]. HGF обладает кардиопротективным и антиапоптотическим эффектом, повышая выживаемость кардиомиоцитов при моделировании ишемии *in vitro* [49, 50]. Нейтрализация эндогенного HGF приводит к увеличению зоны инфаркта и гибели кардиомиоцитов [50]. В нашем исследовании уровни экспрессии и секреции HGF МСК ЖТ коррелировали ($r = 0,73$, $p < 0,0001$); в группе СН + О наблюдалась тенденция к повышению уровня этого фактора, что соответствует относительно благоприятному прогнозу течения заболевания у больных СН с высоким ИМТ [20].

В нашем исследовании наиболее низкие значения MCP1 на транскрипционном и секреторном уровне (на уровне тенденции) были выявлены в группе изолированной СН. Как уже отмечено выше, основной известной функцией MCP1 является контроль миграции моноцитов и макрофагов. Рекрутированные моноциты и макрофаги, в свою очередь секретируют TGFβ1 [44], IL6, IL8, IL1β, MCP1, TNFα, MMP9 [51], опосредуя местное воспаление и способствуя ремоделированию миокарда. Индуцированная MCP1 миграция вовлеченных в процесс воспаления клеток в область повреждения (например ИМ) является компонентом процесса заживления, однако длительная индукция воспаления приводит к патологическому ремоделированию отдаленных участков ткани (в случае ИМ – ткани миокарда [52].

Выявленное отсутствие различий в уровне экспрессии и секреции TGFβ1 в МСК ЖТ исследованных нами группах также следует оценивать в свете плейотропного действия TGFβ1. Известно, что TGFβ1 может стимулировать как ангиогенез, так и профибротические процессы [36]: таким образом, изменение уровня секреции TGFβ1 в любом направлении может иметь как положительный, так и отрицательный физиологический эффект.

В заключение следует отметить, что использование первичных культур МСК ЖТ от больных СН с коморбидностями (ожирение и сахарный диабет) и здоровых доноров, позволило нам провести сравнительный анализ ключевых функциональных свойств этих клеток. Наличие СД приводит к снижению пролиферативной активности МСК ЖТ, и воздействует на некоторые ключевые цитокины, вовлеченные в регуляцию ангиогенеза и воспаления. Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о низкой перспективности использования образцов МСК ЖТ полученных от больных СН с коморбидностями в клинических протоколах. Коррекция измененных свойств МСК может быть достигнута, например, методами генетической инженерии, изменений условий культивирования от стандартных (прекондиционирование), и другими способами. В иных случаях, аллогенная трансплантация может быть предпочтительной для проведения клеточной терапии больных СД по разным показаниям.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007-2013 годы» (Государственный контракт № 02.527.11.0007 от 30 апреля 2009 года) и Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (Государственный контракт № К-32-НИР/111-3 от 24 октября 2011 года) в рамках программы Союзного государства «Стволовые клетки».

Литература

1. *Cowie M.R., Wood D.A., Coats A.J.S.* Incidence and aetiology of heart failure. A population-based study // Eur. Heart. J. – 1999. – Vol. 20. – P. 421–428.

2. *Cafagna D., Ponte A., Burri R.* The concept of quality of life in cardiac failure // Minerva Medica. – 1997. – Vol. 88. – P. 151–162.

3. *Беленков Ю.Н., Мареев В.Ю., Агеев Ф.Т.* Медикаментозные пути улучшения прогноза больных хронической сердечной недостаточности / Данные 20-летнего наблюдения. – М., 1997. – С. 80.

4. *Литяева Т.Ю.* Хроническая сердечная недостаточность в популяции больных сахарным диабетом 2-го типа // Сердечная недостаточность. – 2010. – Т. 11, № 4. – С. 213–215.

5. *Белялов Ф.И.* Лечение внутренних болезней в условиях коморбиднос. – Иркутск: РИО ИГМАПО, 2012. – 283 с.

6. *Becher M.U., Nickenig G., Werner N.* Regeneration of the vascular compartment // Herz. – 2010. – Vol. 35, № 5. – P. 342-351.

7. *Molero A.E., Gokhan S., Gonzalez S. et al.* Impairment of developmental stem cell-mediated striatal neurogenesis and pluripotency genes in a knock-in model of Huntington's disease // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. – Vol. 106, № 51. – P. 21900–21905.

8. *Thornell L.E., Lindstöm M., Renault V. et al.* Satellite cell dysfunction contributes to the progressive muscle atrophy in myotonic dystrophy type 1 // Neuropathol. Appl. Neurobiol. – 2009. – Vol. 35, № 6. – P. 603–613.

9. *Prockop D.* Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms // Mol. Ther. – 2009. – Vol. 17, № 6. – P. 939–946.

10. *Schraufstatter I.U., Discipio R.G., Khaldoyanidi S.* Mesenchymal stem cells and their microenvironment // Front. Biosci. – 2011. – Vol. 17. – P. 2271–2288.

11. *Анисимов С.В.* Клеточная терапия болезни Паркинсона: II. Применение соматических стволовых клеток // Успехи Геронтологии. – 2009. – Т. 22. – С. 150–166.

12. *Anisimov S.V., Morizane A., Correia A.S.* Risks and mechanisms of oncological disease following stem cell transplantation // Stem Cell Rev. Rep. – 2010. – Vol. 6. – C. 411–424.

13. *Dmitrieva R.I., Minullina I.R., Bilibina A.A., Tarasova O.V., Anisimov S.V., Zaritskey A.Yu.* Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue- derived mesenchymal stem cells: differences and similarities //. Cell Cycle. – 2012. – Vol. 11, № 2. – P. 377–383.

14. *da Silva Meirelles L., Chagastelles P.C., Nardi N.B.* Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues // J. Cell Sci. – 2006. – Vol. 119. – P. 2204–2213.

15. *Mosna F., Sensebé L., Krampera M.* Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide // Stem Cells Dev. – 2010. – Vol. 19, № 10. – P. 1449–1470.

16. *Ahmadian Kia N., Bahrami A.R., Ebrahimi M. et al.* Comparative analysis of chemokine receptor's expression in mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and adipose tissue // J. Mol. Neurosci. – 2011. – Vol. 44, № 3. – P. 178–185.

17. Rosengren A.H., Renström E. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in type 1-diabetes // Islets. – 2009. – Vol. 1, № 1. – P. 81–83.

18. *Wen Y., Chen B., Ildstad S.T.* Stem cell-based strategies for the treatment of type 1 diabetes mellitus // Expert Opin. Biol. Ther. – 2011. – Vol. 11, № 1. – P. 41–53.

19. *Patel S.A., Rameshwar P.* Stem cell transplantation for hematological malignancies: prospects for personalized medicine and co-therapy with mesenchymal stem cells // Curr. Pharmacogenomics Person. Med. – 2011. – Vol. 9, № 3. – P. 229–239.

20. *von Haehling S., Lainscak M., Doehner W. et al.* Diabetes mellitus, cachexia and obesity in heart failure: rationale and design of the Studies Investigating Co-morbidities Aggravating Heart Failure (SICA-HF) // J. Cachexia Sarcopenia Muscle. – 2010. – Vol. 1, № 2. – P. 187–194.

21. *Schwartz M.W., Peskind E., Raskind M., et al.* Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans // Nat. Med. – 1996. – Vol. 2. – P. 589–593.

22. *Fantuzzi G.* Adipose tissue, adipokines, and inflammation // J. Allergy Clin. Immunol. – 2005. – Vol. 115, № 5. – P. 911–919.

23. *Berg A.H., Scherer P.E.* Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease // Circ Res. – 2005. – Vol. 96. – P. 939–949.

24. *Dimmeler S., Leri A.* Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy // Circ. Res. – 2008. – Vol. 102, № 11. – P. 1319–1330.

25. *Khan M, Akhtar S, Mohsin S, et al.* Growth factor preconditioning increases the function of diabetes-impaired mesenchymal stem cells // Stem Cells Dev. – 2011. – Vol. 20, № 1. – P. 67–75.

26. *Valorani M.G., Montelatici E., Germani A. et al.* Pre-culturing human adipose tissue mesenchymal stem cells under hypoxia increases their adipogenic and osteogenic differentiation potentials // Cell Prolif. – 2012. – Vol. 45, № 3. – P. 225–238.

27. *Fortini C, Toffoletto B., Fucili A. et al.* Circulating stem cell vary with NYHA stage in heart failure patients // J. Cell. Mol. Med. – 2011. – Vol. 15, № 8. – P. 1726–1736.

28. *Bozkurt B., Mann D.L., Deswal A.* Biomarkers of inflammation in heart failure // Heart Fail. Rev. – 2010. – Vol. 15, № 4. – P. 331-341.

29. *Roytblat L., Rachinsky M., Fisher A. et al.* Raised interleukin-6 levels in obese patients // Obes. Res. – 2000. – Vol. 8. – P. 673–675.

30. *Pou K.M., Massaro J.M., Hoffmann U. et al.* Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study // Circulation. – 2007. – Vol. 116. – P. 1234–1241.

31. *Koleva-Georgieva DN, Sivkova NP, Terzieva D.* Serum inflammatory cytokines IL-1beta, IL-6, TNF-alpha and VEGF have influence on the development of diabetic retinopathy // Folia Med. (Plovdiv). – 2011. – Vol. 53, № 2. – P. 44-50.

32. *Rehman J, Considine RV, Bovenkerk JE, et al.* Obesity if associated with increased levels of circulating hepatocyte growth factor. J. Am. Coll. Cardiol. – 2003. – Vol. 41. – P. 1408–1413.

33. *Christiansen T, Richelsen B, Bruun JM.* Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects // Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. – 2004. – Vol. 29. – P. 146–150.

34. *Bernal-Lopez M.R., Llorente-Cortes V., Calleja F. et al.* Effect of different degrees of impaired glucose metabolism on the expression of inflammatory markers in monocytes of patients with atherosclerosis // Acta Diabetol. – 2011.

35. *Doronzo G., Viretto M., Russo I. et al.* Effects of high glucose on vascular endothelial growth factor synthesis and secretion in aortic vascular smooth muscle cells from obese and lean zucker rats // Int. J. Mol. Sci. – 2012. – Vol. 13, № 8. – P. 9478–9488.

36. *Mirotsou M., Jayawardena T.M., Schmeckpeper J. et al.* Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart // J. Mol. Cell Cardiol. – 2011. – Vol. 50, № 2. – P. 280–289.

37. *Sala V., Crepaldi T.* Novel therapy for myocardial infarction: can HGF/Met be beneficial? // Cell. Mol. Life Sci. – 2011. – Vol. 68. – P. 1703–1717.

38. *Fisman E.Z, Tenenbaum A.* The ubiquitous interleukin-6: a time for reappraisal // Cardiovasc. Diabetol. – 2010. – Vol. 9. – P. e62.

39. *Ridker P.M., Rifai N., Stampfer M.J. et al.* Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men // Circulation. – 2000. – Vol. 101, № 15. – P. 1767–1772.

40. *Vasan R.S., Sullivan L.M., Roubenoff R., et al.* Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without prior myocardial infarction: the Framingham Heart Study // Circulation. – 2003. – Vol. 107. – P. 1486–1491.

41. *Spranger J., Kroke A., Möhlig M. et al.* Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study // Diabetes. – 2003. – Vol. 52. – P. 812–817.

42. *Tchaikovski V., Olieslagers S., Böhmer F.D. et al.* Diabetes mellitus activates signal transduction pathways resulting in vascular endothelial growth factor resistance of human monocytes // Circulation. – 2009. – Vol. 120, № 2. – P. 150–159.

43. *Madonna R., Cevik C., Nasser M. et al.* Hepatocyte growth factor: Molecular biomarker and player in cardioprotection and cardiovascular regeneration // Thromb. Haemost. – 2012. – Vol. 107. – P. 656–661.

44. *Rull A., Camps J., Alonso-Villaverde C. et al.* Insulin resistance, inflammation, and obesity: role of monocyte chemoattractant protein-1 (or CCL2) in the regulation of metabolism // Mediators Inflamm. – 2010. – Vol. 2010. – P. 326–580.

45. *Kapur N.K.* Transforming growth factor-β: governing the transition from inflammation to fibrosis in heart failure with preserved left ventricular function // Circ. Heart Fail. – 2011. – Vol. 4, № 1. – P. 5–7.

46. *Westermann D., Lindner D., Kasner M. et al.* Cardiac inflammation contributes to changes in the extracellular matrix in patients with heart failure and normal ejection fraction // Circ. Heart Fail. – 2011. – Vol. 4, № 1. – P. 44–52.

47. *Nian M, Lee P, Khaper N et al.* Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling // Circ Res. – 2004. – Vol. 94, № 12. – P. 1543–1553.

48. *Waltenberger J.* VEGF resistance as a molecular basis to explain the angiogenesis paradox in diabetes mellitus // Biochem. Soc. Trans. – 2009. – Vol. 37, № 6. – P. 1167–1170.

49. *Ueda H., Nakamura T., Matsumoto K., et al.* A potential cardioprotective role of hepatocyte growth factor in myocardial infarction in rats // Cardiovasc. Res. – 2001. – Vol. 51. – P. 41–50.

50. *Nakamura T., Mizuno S., Matsumoto K., et al.* Myocardial protection from ischemia/ reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF // J. Clin. Invest. – 2000. – Vol. 106. – P. 1511–1519.

51. *Farb M.G., Bigornia S., Mott M. et al.* Reduced adipose tissue inflammation represents an intermediate cardiometabolic phenotype in obesity // J. Am. Coll. Cardiol. – 2011. – Vol. 58, № 3. – P. 232–237.

52. *Heymans S., Hirsch E., Anker S.D. et al.* Inflammation as a therapeutic target in heart failure? A scientific statement from the Translational Research Committee of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology // Eur. J. Heart Fail. – 2009. – Vol. 11, № 2. – P. 119–129.

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ МОДУЛИРОВАНИЯ И ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЭНДОГЕННЫХ микроРНК

А.В. Федоров, А.А. Костарева

Федеральный Центр сердца крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

Федоров Антон Владимирович – кандидат биологических наук, заведующий НИЛ молекулярно-клеточных механизмов атеросклероза Института молекулярной биологии и генетики ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова; *Костарева Анна Александровна* – кандидат медицинских наук, директор Института молекулярной биологии и генетики ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. E-mail: antonfedorow@gmail.com (Федоров Антон Владимирович).

Резюме.

В настоящем обзоре обсуждаются методы детекции и модуляции уровней эндогенных микроРНК. Существующие методики базируются на антисенс технологиях и применяются как для изучения фундаментальных аспектов биогенеза микроРНК, так и для усовершенствования алгоритмов диагностики и терапии заболеваний связанных с дерегуляцией сигнальных путей с участием микроРНК. Рассматриваются варианты детекции микроРНК в фиксированных препаратах клеток и тканей и в системах in vivo, способы ингибирования и восстановления уровней эндогенных микроРНК, а также примеры микроРНК являющихся потенциальными мишенями для терапии сердечнососудистых заболеваний.

Ключевые слова: гибридизация in situ, анти-микроРНК, аналоги миркоРНК.

MODERN METHODS FOR MODULATION AND IMAGING OF ENDOGENOUS microRNA

A.V. Fedorov, A.A.Kostareva

Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova st., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: antonfedorow@gmail.com (Anton V. Fedorov – PhD, Head of the Scientific Research Laboratory of molecular-cell atherosclerosis mechanisms, Institute of Molecular Biology and Genetics).

Abstract.

Here we discuss methods for modulation and imaging of endogenous microRNAs. Existing techniques based on antisense technology and are used to study the fundamental aspects of microRNA biogenesis, as well as for the improvement of diagnostic and therapy of diseases associated with the deregulation of signaling pathways involving microRNAs. We considered options for microRNA detection in fixed preparations of cells and tissues, and in systems in vivo, as well as methods of suppression and replacement of endogenous microRNAs. Finally we mention several of microRNAs which represent novel therapeutic targets for cardiovascular diseases.

Key words: hybridization in situ, anti-microRNA, microRNA mimics.

Статья поступила в редакцию 27.09.2012, принята 01.10.2012.

Введение

МикроРНК – класс не транслируемых РНК, которые являются важным компонентом координированной регуляции ключевых клеточных процессов [1]. Развитие патологических процессов, в частности онкологической трансформации клеток и ряда сердечнососудистых заболеваний связано с изменением уровней определенных микроРНК в тканях и физиологических жидкостях [2]. Разработка и внедрение в лабораторную практику методов измерения уровней микроРНК в физиологических жидкостях позволяет исследовать и использовать потенциал циркулирующих микроРНК служить специфичными биомаркерами заболеваний [3].

В настоящее время активно развиваются методики на базе антисенс технологий для визуализации и модулирования уровней конкретных эндогенных микроРНК с помощью модифицированных синтетических олигонуклеотидов.

Визуализация микроРНК в фиксированных препаратах клеток и тканей имеет важное диагностическое значение, так как позволяет определять внутритканевую локализацию, тип и долю клеток экспрессирующих определенную микроРНК.

Методы прижизненной доставки зондов специфичных к конкретным микроРНК являются перспективным направлением развития алгоритмов как диагностики и так терапии патологических состояний связанных с изменением уровней микроРНК. Диагностические задачи могут быть решены с помощью доставки меченых зондов и последующей визуализацией клеток экспрессирующих определенную микроРНК in vivo. В тех случаях, когда изменение уровня микроРНК является причиной развития заболевания доставка зондов являющихся ингибиторами или аналогами определенной эндогенной микроРНК может быть использована в терапевтических целях.

Детекция микроРНК в фиксированных препаратах тканей с помощью гибридизации in situ

Уровень экспрессии определенной микроРНК зависит от типа и фенотипического состояния клеток. Таким образом, методики визуализации микроРНК в составе тканей позволяют получить информацию о локализации и состоянии разных типов клеток, которая имеет важное диагностическое значение при анализе гетерогенных образцов, таких например, как фрагменты опухолей или атеросклеротических бляшек. Для детекции микроРНК в составе тканей применяются методики, основанные на гибридизации нуклеиновых кислот, адаптированные с учетом особенностей строения микроРНК. Зрелые молекулы микроРНК имеют длину всего 22 нуклеотида, при этом разные микроРНК имеют разный нуклеотидный состав, так, что температуры плавления колеблются от 40 до 80° С. Для того, чтобы детекция таких коротких молекул с помощью гибридизации с гомологичными им зондами была специфична в состав зондов вводят модифицированные нуклеотиды, которые повышают температуру плавления. Кроме этого при исследовании сразу нескольких микроРНК с разными температурами плавления введение модификаций позволяет приблизить температуры отжига разных зондов к одному значению, что упрощает проведение этапов гибридизации и постгибридизационных отмывок. Одним из типов используемых модифицированных нуклеотидов являются так называемые ‘закрытые’ нуклеотиды (locked nucleic acids, LNA), в которых введена дополнительная связь между кислородом в положении 2’ и углеродом в положении 4’ рибозы. Включение в последовательность зонда одного LNA-нуклеотида повышает его температуру плавления на 2–10 °С.

Для визуализации активно экспрессирующихся микроРНК могут быть использованы LNA-модифицированные зонды прямо меченые флуоресцентными красителями. В случае исследования микроРНК экспрессирующихся на низких уровнях применяют протоколы амплификации сигнала. Наиболее распространенной системой является использование LNA-модифицированных зондов меченых дигоксигенином, которые детектируют с использованием антител против дигоксигенина конъюгированных со щелочной фосфатазой. Амплификация визуализируемого сигнала происходит за счет накопления преципитата окрашенных продуктов ферментативной реакции. Также может применяться система амплификации с тирамидом. В этом случае для детекции LNA-модифицированного зонда меченого дигоксигенином или флуоресцеином используют соответствующие антитела конъюгированные с пероксидазой. Далее препарат инкубируют с конъюгатом тирамида с биотином или флуоресцеином. Пероксидаза катализирует переход тирамида в активированное состояние и его накопление в непосредственной окрестности гибридизовавшегося зонда. Методика гибридизации in situ может быть применена для детекции микроРНК в препаратах как парафиновых так и криосрезов [4, 5].

Терапевтические агенты для модуляции эндогенных микроРНК

Исследование функциональной роли микроРНК в регуляции клеточных процессов совместно с анализом данных об изменении уровней микроРНК в ходе развития заболевания позволяет предсказать конкретные микроРНК нарушение экспрессии которых может являться одним из факторов развития патологического состояния. В настоящее время активно изучается потенциал использования модифицированных синтетических олигонуклеотидов для терапии и диагностики таких микроРНК зависимых состояний.

Ряд свойств микроРНК делает их перспективными кандидатами на роль мишеней для новых лекарств. Во-первых, это небольшой размер и известные консервативные последовательности микроРНК. Во-вторых, под контролем конкретной микроРНК находится как правило несколько функционально связанных генов. Поэтому воздействие на определенную микроРНК приведет к согласованному изменению сразу нескольких компонентов сигнального пути, блокированию компенсаторных механизмов и, как следствие, может иметь более сильный регуляторный эффект. Это особенно актуально для усовершенствования методик терапии заболеваний в основе патогенеза которых лежит неправильное функционирование целых сигнальных путей, а не единичных генов.

Для модулирования уровней микроРНК применяют две альтернативные стратегии в зависимости от того повышение или понижение экспрессии эндогенной микроРНК является причиной развития заболевания.

Ингибиторы эндогенных микроРНК

В тех случаях, когда необходимо понизить уровень эндогенной микроРНК используются кроткие однонитевые олигонуклеотиды комплементарные этой микроРНК. Такие синтетические молекулы получили название анти-

микроРНК (anti-microRNA). В клетке анти-микроРНК взаимодействуют с комплементарной эндогенной микроРНК и нарушают ее репрессирующие функции. Точный механизм действия анти-микроРНК еще предстоит выяснить [6].

Для повышения чувствительности и специфичности связывания с мишенью, а также устойчивости к деградации в состав анти-микроРНК вводят ряд модифицированных нуклеотидов. Кроме описанных выше LNA-нуклеотидов, также используют 2′-О-метил и 2′-О-метоксиэтил аналоги [7–9]. Дополнительно стабильность анти-микроРНК может быть повышена за счет введения межнуклеотидных фосфотиоатных групп, а конъюгация анти-микроРНК с холестерином улучшает эффективность внутриклеточной доставки [8, 10].

Аналоги эндогенных микроРНК

Установлено, что в норме многие микроРНК негативно регулируют развитие патологических процессов. Поэтому уменьшение уровней таких микроРНК, например обладающих функциями опухолевых супрессоров, вызывает соответствующие заболевания [11]. В таких случаях, восстановить нарушенные сигнальные пути можно за счет повышения уровня эндогенной микроРНК. Для этого используют синтетические кроткие двунитевые РНК, сконструированные таким образом, что одна нить дуплекса идентична зрелой микроРНК [12]. Двунитевая структура аналогов микроРНК необходима для распознавания клеточной машинерией РНК-зависимой регуляции экспрессии генов. Для правильного включения в эффекторный комплекс нити идентичной зрелой микроРНК применяют дополнительный химические модификации РНК в составе синтетического дуплекса [13]. После попадания в клетку синтетические аналоги микроРНК включаются в эффекторный комплекс, функционально замещают дерегулированные эндогенные микроРНК и восстанавливают сигнальные пути функционировавшие в норме. Аналоги микроРНК не отличаются от эндогенных молекул и поэтому маловероятно, что их введение приведет к не специфическим побочным эффектам. Кроме этого, поскольку аналоги и эндогенные микроРНК имеют одинаковую нуклеотидную последовательность, можно ожидать, что синтетический аналог будет регулировать тот же набор генов, что и эндогенная микроРНК в норме. Важно отметить, что препарат на основе синтетического аналога будет действовать на все эндогенные мишени микроРНК, в том числе и те которые пока неизвестны.

Способы доставки в клетку ингибиторов и аналогов эндогенных микроРНК

В настоящее время применяется несколько способов доставки агентов на основе микроРНК в экспериментальных животных моделях и системах культивации in vitro.

Одной из систем доставки аналогов микроРНК являются вирусные вектора, кодирующие предшественники микроРНК. В этом случае для созревания функциональная короткой двунитевой РНК необходим дополнительный внутриклеточный процессинг транскрипта предшественника с участием белков Drosha и Dicer. Преимуществом этого метода доставки является высокая эффективность трансфекции и продолжительная экспрессия экзогенной микроРНК. Ограничивает использование векторых конструкций трудоемкость их изготовления, а также сложности связанные с иммуногенностью и токсичностью [14, 15].

Альтернативным способом является непосредственная доставка синтетических коротких однонитевых ингибиторов микроРНК или двунитевых аналогов микроРНК. В этом случае доставка может быть опосредована каким-либо носителем, например липосомами. Особое внимание уделяется разработке способов направленной доставки микроРНК. Для этого поверхности носителей покрывают тканеспецифичными лигандами [16, 17].

Кроме этого высокая стабильность модифицированных синтетических олигонуклеотидов позволяет доставлять их в клетки и без носителя. Доставка синтетических олигонуклеотидов без носителя может быть осуществлена в культурах клеток. В частности показано, что LNA-модифицированные фосфотиоатные олигонуклеотиды эффективно поглощаются клетками in vitro и участвуют в специфичной регуляции генов [18, 19]. Использование этого метода позволяет избежать возможные побочные воздействия реагентов для трансфекции на исследуемую систему.

В животных моделях синтетические олигонуклеотиды также могут доставляться без носителя. Одним из распространенных способов является системная доставка посредством внутривенного или подкожного введения раствора олигонуклеотида в физиологическом буфере. В течение нескольких часов после введения уровни аналогов или ингибиторов микроРНК в плазме уменьшаются за счет поглощения их клетками. В случае ингибиторов микроРНК показано, что после системного введения эти молекулы формируют гетеродуплексы с эндогенными микроРНК и таким образом подавляют их активность [7]. При этом высокая метаболическая стабильность синтетических олигонуклеотидов позволяет им находиться в функциональном состоянии в тканях в течении нескольких недель [20, 21]. Эффекты от введения аналогов или ингибиторов некоторых микроРНК проявляются с задержкой, что вероятно обусловлено необходимостью запуска или выключения множества последовательных регуляторных событий, которые контролируются эндогенными микроРНК [8, 22].

Примеры использования антисенс технологий для модулирования уровней микроРНК связанных с сердечнососудистыми заболеваниями

микроРНК-208а и переключение изоформ миозинов

Нормальное функционирование сердечной мышцы зависит от функционирования миозинов MYH6 и MYH7. Известно, даже небольшое понижение экспрессии MYH6 и повышение экспрессии MYH7 в ответ на стресс нарушает сократимость [23, 24]. Изучение структуры генов миозинов и механизмов регуляции их экспрессии позволило выявить потенциальную мишень для терапии

патологических изменений в миокарде. Этой мишенью является микроРНК-208a. микроРНК-208a, которая кодируется интроном MYH6, необходима для активации экспрессии гена MYH7 в ответ на стресс, участвует в регуляции переключения экспрессии изоформ миозина и таким образом влияет на сократимость и развитие гипертрофии сердечной мышцы [2, 25]. Системная доставка LNA-модифицированного анти-микроРНК-208a олигонуклеотида в крысиной модели ответа миокарда на стресс эффективно подавляет эндогенную микроРНК-208a, но не сходную по первичной последовательности микроРНК-208b, супрессиует переключение экспрессии изоформ миозина, предотвращает патологическое ремоделирование сердечной мышцы и улучшает выживаемость животных, не вызывая при этом побочных эффектов [22]. В отличие от грызунов, у человека основной изоформой миозина является MYH7 и кодируемая интроном MYH6 микроРНК-208a экспрессируется на более низком уровне [26]. Поэтому данные по использованию микроРНК-208a в качестве терапевтической мишени полученные на крысиной модели требуют детальной проверки у больших млекопитающих.

микроРНК-133a и гипертрофия миокарда

МикроРНК-133a регулирует пролиферацию и дифференцировку мышечных клеток и поэтому также является потенциальной мишенью для терапии заболеваний сердца с использованием антисенс технологий [2]. Увеличение уровня микроРНК-133a с помощью аденовирусной конструкции подавляет активированную гипертрофию кардиомиоцитов in vitro. В экспериментах на мышах репрессирование микроРНК-133a с помощью анти-микроРНК-133a индуцирует гипертрофию миокарда [27].

микроРНК-221, микроРНК-145 и формирование неоинтимы

В нормальном не поврежденном сосуде гладкомышечные клетки имеют сократительный фенотип. В ответ на внешние повреждающие факторы гладкомышечные клетки могут активироваться и начать пролиферировать, синтезируя компоненты внеклеточного матрикса и провоспалительные сигнальные молекулы.

Уровень микроРНК-145 заметно снижается, а уровень микроРНК-221 повышается в неоинтиме после повреждения стенки сосуда, и при дедифференцировке гладкомышечных клеток в процессе культивирования in vitro. Модулирование уровней микроРНК-145 и микроРНК-221 в культивируемых гладкомышечных клеток с помощью ингибиторов и аналогов микроРНК провидит к согласованным изменениям фенотипа [28–31]. Таким образом, микроРНК-145 и микроРНК-221 являются важными регуляторами и маркерами пролиферативного и сократительного фенотипов гладкомышечных клеток, соответственно [28]. Поскольку состояние гладкомышечных клеток играет критическую роль в процессе развития атеросклеротической бляшки, регуляторы этого состояния, микроРНК-145 и микроРНК-221 могут служить потенциальными мишенями для терапии атеросклероза. В модели баллонного повреждения сонной артерии у крыс установлено, что подавление уровня микроРНК-221 или восстановление уровня микроРНК-145 посредством локальной доставки ингибитора анти-микроРНК-221 или аденовируса, кодирующего предшественник аналога микроРНК-145, замедляет формирование неоинтимы [28, 31, 32].

Сочетание прижизненной визуализации и репрессирования эндогенных микроРНК

Визуализации эндогенных микроРНК в живых клетках служит информативным методом изучения биогенеза этих молекул, а также может применяться в диагностических целях для неинвазивной прижизненной детекции микроРНК-биомаркеров. Один из способов прижизненной детекции микроРНК основан на использовании специальных олигонуклеотидных зондов, получивших название ‘молекулярные маяки’ (molecular beacons). 5’-конец такого олигонуклеотида конъюгирован с флуорохромом, 3’-конец – с гасителем флуоресценции. Средний участок олигонуклеотида комплементарен исследуемой мишени. Концевые участки комплементарны друг другу и в отсутствии специфичной мишени формируют шпильку, сближая флуорохром и гаситель, так что флуоресценция не детектируется. В присутствии специфичной мишени зонд формирует с ней стабильный комплекс, при этом флуорохром и гаситель расходятся на достаточное для детекции флуоресценции расстояние. Преимуществами использования ‘молекулярных маяков’ для детекции нуклеотидных мишеней являются отсутствие необходимости отмывки не связавшегося зонда, отсутствие этапов амплификации и иммобилизации [33]. Описаны примеры использования ‘молекулярных маяков’ для прижизненной детекции микроРНК-155, которая может быть использована в качестве диагностического биомаркера рака легких [34], детекции микроРНК-26a и микроРНК-206 в качестве маркеров миогенной дифференцировки [35]. Следует отметить, что зонды на основе ‘молекулярных маяков’ могут применяться для сочетания диагностики и терапии заболеваний посредством одновременной визуализации клеток экспрессирующих конкретную эндогенную микроРНК и репрессирования этой микроРНК [17].

Прогресс в понимании механизмов РНК-зависимой регуляции экспрессии генов, в сочетании с определением роли конкретных микроРНК в нормальных и патологических клеточных процессах создает предпосылки для активного развития диагностических и терапевтических методов на базе антисенс технологий. Ключевыми факторами от которых зависит дальнейшее внедрение этих методик являются усовершенствование технологий направленной тканеспецифичной доставки аналогов и ингибиторов микроРНК, эффективность предсказания новых специфичных мишеней, а также воспроизводимость данных полученных на модельных системах [36] при анализе групп пациентов.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ по государственной поддержке ведущих научных школ (НШ-2359.2012.7) и при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (Рособразование, № ГК Р1308).

Литература

1. *Ketting R.F.* MicroRNA biogenesis and function. An overview // Adv Exp Med Biol. – 2010. – Vol. 700. – P. 1–14.

2. *Liu N., Olson E.N.* MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development // Dev Cell. – 2010. – Vol. 18. –P. 510–525.

3. *Федоров А., Костарева А., Галагудза М. и др.* микроРНК как биомаркеры повреждения миокарда // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2012. – Т. 11. – № 3. – С. 69–75.

4. *Jorgensen S., Baker A., Moller S. et al.* Robust one-day in situ hybridization protocol for detection of microRNAs in paraffin samples using LNA probes // Methods. – 2010. – Vol. 52. – P. 375–381.

5. *Silahtaroglu A.N., Nolting D., Dyrskjot L. et al.* Detection of microRNAs in frozen tissue sections by fluorescence in situ hybridization using locked nucleic acid probes and tyramide signal amplification // Nat Protoc. – 2007. – Vol. 2. – P. 2520–2528.

6. *Stenvang J., Petri A., Lindow M. et al.* Inhibition of microRNA function by antimiR oligonucleotides // Silence. – 2012. – Vol. 3. – P. 1.

7. *Elmen J., Lindow M., Schutz S. et al.* LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates // Nature. – 2008. – Vol. 452. – P. 896–899.

8. *Krutzfeldt J., Rajewsky N., Braich R. et al.* Silencing of microRNAs in vivo with ‚antagomirs‘ // Nature. – 2005. – Vol. 438. – P. 685–689.

9. *Esau C., Davis S., Murray S.F. et al.* miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting // Cell Metab. – 2006. – Vol. 3. – P. 87–98.

10. *Rooij E.* The art of microRNA research // Circ Res. – 2011. – Vol. 108. – P. 219–234.

11. *Lu J., Getz G., Miska E.A. et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers // Nature. – 2005. – Vol. 435. – P. 834–838.

12. *Xiao J., Yang B., Lin H. et al.* Novel approaches for gene-specific interference via manipulating actions of microRNAs: examination on the pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 // J Cell Physiol. – 2007. – Vol. 212. – P. 285–292.

13. *Martinez J., Patkaniowska A., Urlaub H. et al.* Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi // Cell. – 2002. – Vol. 110. – P. 563–574.

14. *Rayner K.J., Suarez Y., Davalos A. et al.* MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis // Science. – 2010. – Vol. 328. – P. 1570–1573.

15. *Kota J., Chivukula R.R., O'Donnell K.A. et al.* Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model // Cell. – 2009. – Vol. 137. – P. 1005–1017.

16. *Anand S., Majeti B.K., Acevedo L.M. et al.* MicroRNA-132-mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis // Nat Med. – 2010. – Vol. 16. – P. 909–914.

17. *Kim J.K., Choi K.J., Lee M. et al.* Molecular imaging of a cancer-targeting theragnostics probe using a nucleolin aptamer- and microRNA-221 molecular beacon-conjugated nanoparticle // Biomaterials. – 2012. – Vol. 33. – P. 207–217.

18. *Stein C.A., Hansen J.B., Lai J. et al.* Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents // Nucleic Acids Res. – 2010. – Vol. 38. – P. 3.

19. *Torres A.G., Threlfall R.N., Gait M.J.* Potent and sustained cellular inhibition of miR-122 by lysine-derivatized peptide nucleic acids (PNA) and phosphorothioate locked nucleic acid (LNA)/2'-O-methyl (OMe) mixmer anti-miRs in the absence of transfection agents // Artif DNA PNA XNA. – 2011. – Vol. 2. – P. 71–78.

20. *Geary R.S., Yu R.Z., Levin A.A.* Pharmacokinetics of phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides // Curr Opin Investig Drugs. – 2001. – Vol. 2. – P. 562–573.

21. *Krutzfeldt J., Kuwajima S., Braich R. et al.* Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs // Nucleic Acids Res. – 2007. – Vol. 35. – P. 2885–2892.

22. *Montgomery R.L., Hullinger T.G., Semus H.M. et al.* Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure // Circulation. – 2011. – Vol. 124. – P. 1537–1547.

23. *Abraham W.T., Gilbert E.M., Lowes B.D. et al.* Coordinate changes in Myosin heavy chain isoform gene expression are selectively associated with alterations in dilated cardiomyopathy phenotype // Mol Med. – 2002. – Vol. 8. – P. 750–760.

24. *Krenz M., Robbins J.* Impact of beta-myosin heavy chain expression on cardiac function during stress // J Am Coll Cardiol. – 2004. – Vol. 44. – P. 2390–2397.

25. *Rooij E., Sutherland L.B., Qi X. et al.* Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA // Science. – 2007. – Vol. 316. – P. 575–579.

26. *Rooij E., Liu N., Olson E.N.* MicroRNAs flex their muscles // Trends Genet. – 2008. – Vol. 24. – P. 159–166.

27. *Care A., Catalucci D., Felicetti F. et al.* MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy // Nat Med. – 2007. – Vol. 13. – P. 613–618.

28. *Cheng Y., Liu X., Yang J. et al.* MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation // Circ Res. – 2009. – Vol. 105. – P. 158–166.

29. *Zhang C.* MicroRNA-145 in vascular smooth muscle cell biology: a new therapeutic target for vascular disease // Cell Cycle. – 2009. – Vol. 8. – P. 3469–3473.

30. *Cordes K.R., Sheehy N.T., White M.P. et al.* miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity // Nature. – 2009. – Vol. 460. – P. 705–710.

31. *Liu X., Cheng Y., Zhang S. et al.* A necessary role of miR-221 and miR-222 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia // Circ Res. – 2009. – Vol. 104. – P. 476–487.

32. *Davis B.N., Hilyard A.C., Nguyen P.H. et al.* Induction of microRNA-221 by platelet-derived growth factor signaling is critical for modulation of vascular smooth muscle phenotype // J Biol Chem. – 2009. – Vol. 284. – P. 3728–3738.

33. *Tyagi S., Marras S.A., Kramer F.R.* Wavelength-shifting molecular beacons // Nat Biotechnol. – 2000. – Vol. 18. – P. 1191–1196.

34. *Yao Q., Zhang A.M., Ma H. et al.* Novel molecular beacons to monitor microRNAs in non-small-cell lung cancer // Mol Cell Probes. – 2012. – Vol. 26. – P. 182–187.

35. *Kang W.J., Cho Y.L., Chae J.R. et al.* Molecular beacon-based bioimaging of multiple microRNAs during myogenesis // Biomaterials. – 2011. – Vol. 32. – P. 1915–1922.

36. *Федоров А., Минасян С., Костарева А. и др.* Повышение уровня микроРНК-208а в цельной крови после ишемии-реперфузии миокарда у крыс // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2012. – Т. 11. – № 2. – С. 66–71.

ВЛИЯНИЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ НА УРОВЕНЬ ПРОАПОПТОТИЧЕСКОГО БЕЛКА В НЕЙРОНАХ ЗОНЫ CA1 ГИППОКАМПА ПРИ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС

Н.С. Щербак[1], О.В. Бещук[2], М.М. Галагудза[1, 2], Д.А. Овчинников[2], А.Н. Кузьменков[2], Л.Б. Митрофанова[2], Е.Р. Баранцевич[1, 2], Е.В Шляхто[1, 2]

[1] Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия
[2] Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

Щербак Наталия Сергеевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института сердечно-сосудистых заболеваний СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, ведущий научный сотрудник лаборатории нанотехнологий; *Бещук Ольга Владимировна* – младший научный сотрудник лаборатории патоморфологии; *Галагудза Михаил Михайлович* – доктор медицинских наук, руководитель Института экспериментальной медицины, профессор кафедры патофизиологии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова; *Овчинников Дмитрий Александрович* – лаборант-исследователь Института экспериментальной медицины; *Кузьменков Андрей Николаевич* – лаборант-исследователь Института экспериментальной медицины; *Митрофанова Любовь Борисовна* – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией патоморфологии; *Баранцевич Евгений Робертович* – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой неврологии и мануальной медицины ФПО СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, заведующий НИО ангионеврологии ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России; *Шляхто Евгений Владимирович* – доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН, директор ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России, заведующий кафедрой факультетской терапии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341, ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» МЗ РФ, Институт сердечно-сосудистых заболеваний, ул. Л. Толстого, д. 6/8, Санкт-Петербург, Россия, 197022. E-mail: shcherbakns@yandex.ru (Щербак Наталия Сергеевна).

Резюме.

Ишемическое посткондиционирование (ИПост) – эндогенный способ защиты головного мозга от ишемического и реперфузионного повреждения. Механизмы реализации нейропротективного эффекта ИПост при глобальном ишемическом повреждении остаются неизученными. Цель исследования – исследовать влияние ИПост на уровень проапоптотического белка Bax в нейронах поля CA1 гиппокампа при глобальной ишемии-реперфузии головного мозга у крыс. Глобальную ишемию головного мозга моделировали путем окклюзии магистральных сосудов, отходящих от дуги аорты. ИПост было представлено 3-мя эпизодами по 15-сек/15-сек реперфузии/реокклюзии. Оценивали число жизнеспособных нейронов зоны CA1 гиппокампа, а также количество Bax-позитивных нейронов. Показано, что ИПост приводит к увеличению числа жизнеспособных нейронов в поле CA1 гиппокампа, а также к снижению количества Bax-позитивных нейронов. Полученные результаты показывают, что ИПост уменьшает выраженность повреждения при глобальной ишемии головного мозга. Нейропротективный эффект ИПост, скорее всего, достигается за счет предотвращения апоптоза нейронов в наиболее чувствительных к ишемическому повреждению отделах головного мозга.

Ключевые слова: апоптоз, Bax, гиппокамп, ишемическое посткондиционирование, ишемия-реперфузия, крысы.

THE EFFECT OF ISCHEMIC POSTCONDITIONING ON BAX IN HIPPOCAMPAL CA1 DURING GLOBAL CEREBRAL ISCHEMIA-REPERFUSION IN RATS

N.S. Shcherbak[1], O.V. Beschuk[2], M.M. Galagudza[1, 2], D.A. Ovchinnikov[2], A.N. Kuzmenkov[2], L.B. Mitrofanova[2], E.R. Barantsevich[1, 2], E.V. Shlyakhto[1, 2]

[1] Saint-Petersburg Pavlov State Medical University, Saint-Petersburg, Russia
[2] Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: shcherbakns@yandex. ru (Natalia S. Shcherbak – PhD, Advanced Scientific Scientific Research Laboratory of Nanotechnologies, Institute of Experimental Medicine).

Abstract.
The purpose of the study – to investigate the effect of IPost on the level of pro-apoptotic protein Bax in hippocampal CA1 neurons in global ischemia-reperfusion in the rat brain. Global cerebral ischemia was modeled by occlusion of major vessels extending from the aortic arch. IPost was presented with 3 episodes of 15-sek/15-sek reperfusion / reocclusion. Evaluated the number of viable neurons in the CA1 area of the hippocampus, and the number of Bax-positive neurons. It is shown that IPost increases the number of viable neurons in the CA1 hippocampus, and to reduce the number of Bax-positive neurons. The results show that the IPost reduces the severity of damage in global cerebral ischemia. Neuroprotective effect of IPost is likely achieved by preventing apoptosis of neurons in the most sensitive to ischemic injury of the brain.

Key words: apoptosis, Bax, hippocampus, ischemic postconditioning, ischemia-reperfusion, rats.

Статья поступила в редакцию 02.09.2012, принята к печати 15.09.2012.

Ишемическое повреждение головного мозга является ведущей причиной инвалидизации и смертности в большинстве стран мира [1]. Несмотря на наличие убедительных доказательств нейропротективного эффекта ряда фармакологических препаратов в эксперименте, защитный эффект этих препаратов не был подтвержден в рандомизированных клинических исследованиях [2-4]. В связи с этим поиск новых способов и методов защиты головного мозга от ишемического и реперфузионного повреждения представляется актуальным. В настоящее время исследователей привлекает использование стратегии защиты головного мозга с применением эндогенных механизмов нейропротекции [5-7]. Ишемическое посткондиционирование (ИПост) – эндогенный механизм нейропротекции, реализующийся за счет серии коротких ишемических стимулов, выполненных в раннем реперфузионном периоде после продолжительной ишемии мозга. В недавних исследованиях было установлено, что применение ИПост уменьшает размер инфаркта миокарда, подавляет воспаление и апоптоз [8, 9]. Апоптоз нейронов после ишемии/реперфузии головного мозга является одним из основных механизмов гибели клеток [10]. В ответ на окислительный стресс происходит повышение проницаемости наружной мембраны митохондрий, что приводит к транслокации проапоптотического белка Bax в митохондрии и, напротив, выходу цитохрома с из межмембранного пространства митохондрий в цитозоль [11,12]. Синтез белка Bax контролируется белками семейства Bcl-2 [13]. На модели фокальной ишемии у крыс было установлено, что ИПост способствует уменьшению ишемического и реперфузионного повреждения головного мозга [14], в том числе путем влияния на антиапоптотический механизм, изменяя экспрессию или активность апоптоз-ассоциированных белков [15]. Влияние ИПост на уровень экспрессии и активность апоптоз-ассоциированных белков при глобальном ишемическом и реперфузионном повреждении головного мозга до сих пор остается неизученным.

Цель настоящей работы – исследовать влияние ИПост на уровень проапоптотического белка Bax в пирамидных нейронах поля CA1 гиппокампа при глобальном ишемическом повреждении головного мозга у крыс.

Материалы и методы

Все эксперименты были проведены в соответствии с рекомендациями Этических комитетов ГБОУ ВПО СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова и ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова», а также в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (публикация Национального Института Здоровья США № 85–23).

Моделирование ишемического повреждения. Исследование проводилось на крысах – самцах линии Wistar массой 220-250 г (питомник «Рапполово»), содержащихся в условиях 12/12-часового свето-темнового режима и получавших стандартный корм и питьевую воду *ad libitum*. Животных наркотизировали хлоралгидратом (450 мг/кг, внутрибрюшинно). Обратимую глобальную ишемию (ГИ) головного мозга моделировали окклюзией плечеголовного ствола, левой подключичной артерии и левой общей сонной артерии на 10 минут по ранее описанной методике [16]. ИПост моделировали путем снятия и наложения микрохирургических зажимов на артерии в раннем реперфузионном периоде согласно выбранному протоколу эксперимента – 3 эпизода по 15-сек/15-сек реперфузии/реокклюзии после 10-минутной ГИ с последующей реперфузией, длительность которой составляла 2 суток. Животные были случайным образом разделены на следующие экспериментальные группы: 1) ложная операция (ЛО, n =6); 2) 10-минутная ишемия с последующей реперфузией (И, n = 8); 3) 10-минутная ишемия + ИПост с последующей реперфузией (ИПост, n = 6). Все хирургические вмешательства проводились на термостатируемом операционном столе при температуре 37 °C. В послеоперационном периоде до момента выхода животных из наркоза их температура также поддерживалась на постоянном уровне за счет внешнего источника тепла.

Гистологический анализ. Гистологический анализ проводили у животных каждой группы, выживших к концу вторых суток. Животных наркотизировали хлоралгидратом (450 мг/кг, внутрибрюшинно), извлекали мозг из полости черепа и нарезали на сегменты, используя фронтальную матрицу для головного мозга мелких грызунов (WPI, США). Сегмент, содержащий зону гиппокампа, фиксировали 10% нейтральным формалином и заливали в парафин по общепринятой методике. Фронтальные срезы толщиной 3 мкм, соответствующие стереотаксическому атласу головного мозга крысы (bregma – 3,3 ± 0,2 мм) [17], окрашивали гематоксилином и эозином.

Иммуногистохимический анализ. В нейронах пирамидного слоя зоны CA1 гиппокампа белок Bax выявляли иммуногистохимическим двушаговым непрямым методом связывания полимерной цепи с первичными неконьюгированными антителами. Гистологические срезы

толщиной 3 мкм на предметных стеклах со специальным адгезивным покрытием подвергались депарафинизации в 2 ксилолах и 4 спиртах с убывающей концентрацией от 95,5% до 70%. Для устранения эндогенной пероксидазы срезы подвергались обработке 3% раствором перекиси водорода в течение 5 минут при комнатной температуре. Демаскировка внутритканевых антигенов проводилась в буфере (pH 9,0) при температуре 95-97ºС на водяной бане в течение 30 минут с последующим 20-минутным охлаждением при комнатной температуре. Срезы на предметном стекле обводили гидрофобным карандашом (Elite PAP Pen Diagnostic BioSystems, США) и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре с блокирующей сывороткой (Background Blocker (1X), Diagnostic BioSystems, США) для уменьшения избыточного фонового окрашивания. Далее проводили инкубацию во влажной камере в течение 30 минут при комнатной температуре с первичными поликлональными антителами кролика (Abcam, Великобритания), специфичными к белку Bax в разведении 1:500 на блокирующем растворе (Dako, Дания). После инкубации с первичными антителами срезы дважды промывались в Трис-буфере (TBS, Dako, Дания). Далее наносили полимерную систему с вторичными антителами (Histofine Simple Stain MAX PO (multi), Nichrei Biosciences Inc., Япония) и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. По истечении этого времени срезы вновь дважды промывались в Трис-буфере. Для визуализации метки использовали 3,3'-диаминобензидинтетрахлорид (Histofine DAB3S kit Peroxidase Chromogen/Substrate kit, Nichrei Biosciences Inc., Япония), который выявляет пероксидазную активность фермента на полимерной цепи. На заключительном этапе препараты окрашивались гематоксилином. Дегидратацию препаратов осуществляли при помощи двух 95,5% спиртов, изопропилового спирта и ксилола с последующим заключением срезов в полистирол (BioMount, Италия).

Анализ морфологических изменений и наличие Bax-позитивных нейронов в зоне CA1 гиппокампа проводили при помощи светового микроскопа (Leica, Германия).

Результаты и обсуждение

Было исследовано влияние ИПост на число жизнеспособных нейронов пирамидного слоя зоны CA1 гиппокампа. В группе ложнооперированных животных пирамидный слой нейронов зоны CA1 состоит из пирамидных клеток, расположенных в 3–4 слоя и плотно прилегающих друг к другу. При увеличении ×400 пирамидные нейроны представляют собой большие клетки с прозрачной цитоплазмой и интенсивно окрашенными круглыми ядрами (рис. 1). Через двое суток после 10-минутной полной глобальной ишемии головного мозга в зоне CA1 обнаруживались структурные повреждения пирамидных нейронов. В этой зоне выявлялись сморщенные гипер-

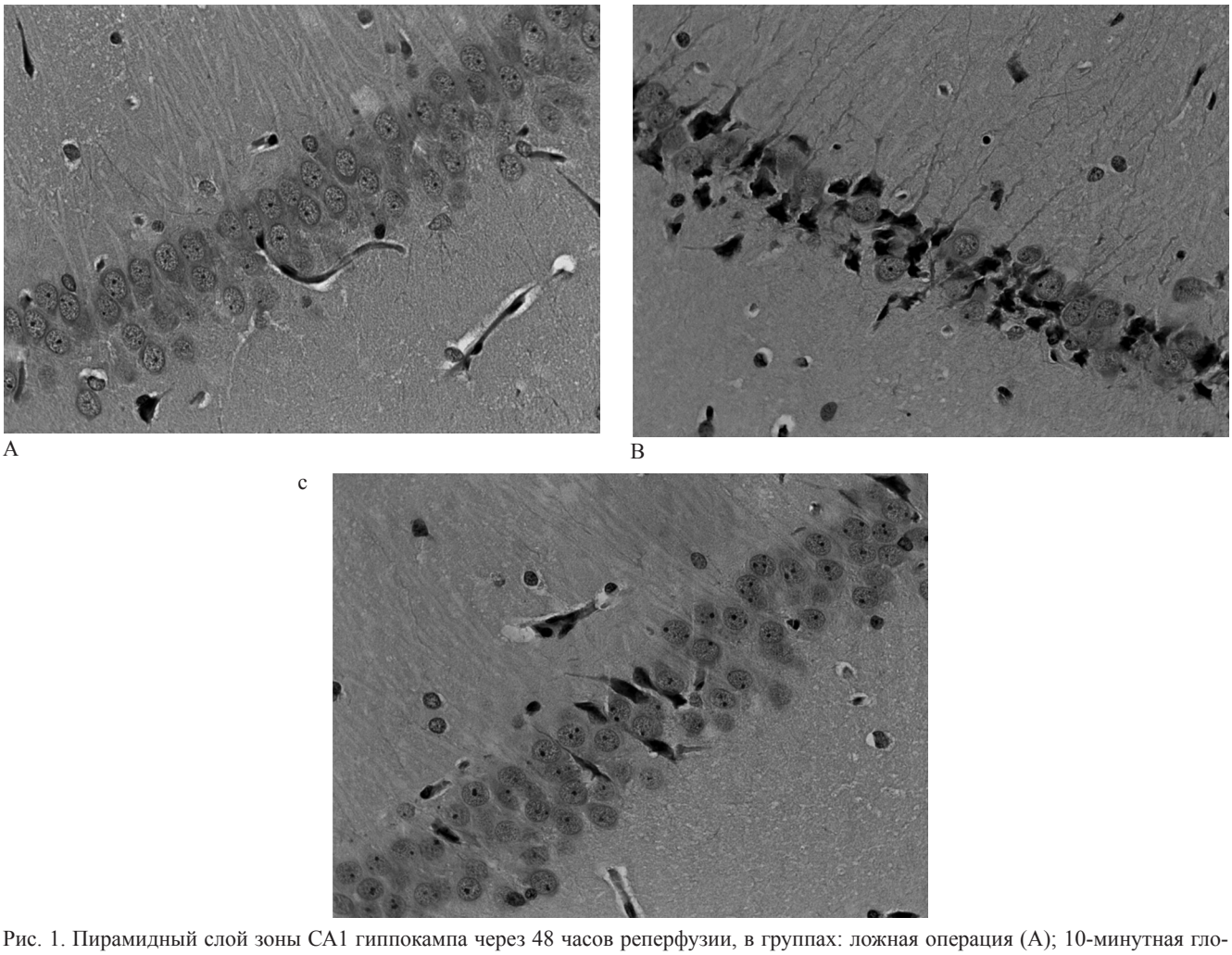


Рис. 1. Пирамидный слой зоны CA1 гиппокампа через 48 часов реперфузии, в группах: ложная операция (А); 10-минутная глобальная ишемия (В); 10-минутная глобальная ишемия+ИПост (С). Окраска гематоксилин-эозин (х400)

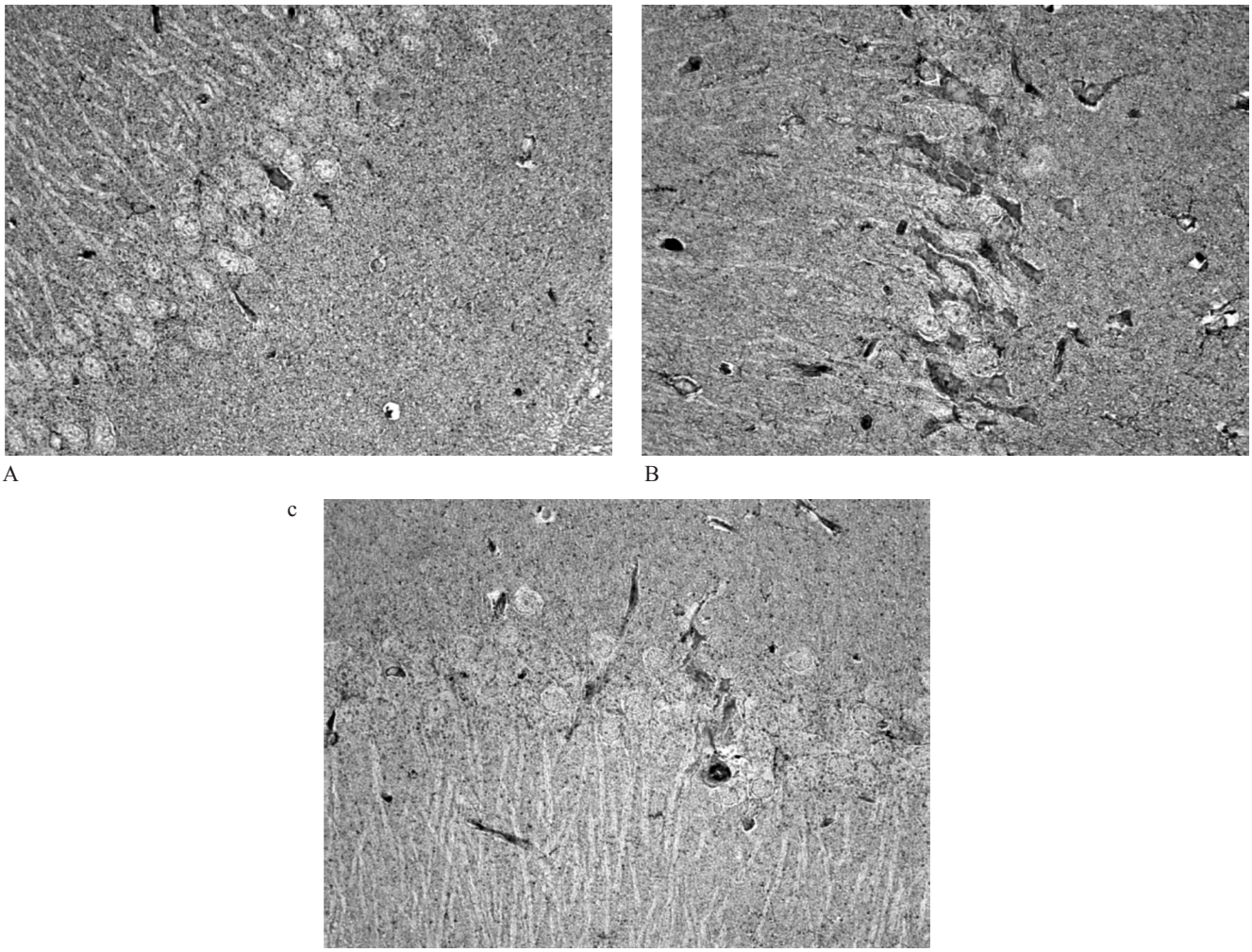


Рис.2 Иммуногистохимическое выявление проапоптотического белка Bax в нейронах пирамидного слоя зоны CA1 гиппокампа через 48 часов после моделирования ишемии в группах: ложная операция (А); 10-минутная глобальная ишемия (Б); 10-минутная глобальная ишемия+ИПост (С), (х400)

хромные с пикнотическими ядрами клетки, наблюдался перицеллюлярный отек, в отдельных нейронах обнаруживался хроматолиз и вакуолизация цитоплазмы (рис. 1). Эти повреждения, обнаруженные спустя двое суток после моделирования глобальной ишемии, объясняются отсроченной гибелью нейронов [18]. Зона CA1 гиппокампа является наиболее уязвимой областью головного мозга к ишемическому и реперфузионному повреждению [6, 7, 16, 18]. Применение ишемических стимулов в раннем реперфузионном периоде в значительной мере способствовало предотвращению индуцируемых ишемическим и реперфузионным повреждением структурных повреждений нейронов в зоне CA1 гиппокампа: наблюдалось увеличение количества жизнеспособных нейронов при сравнении с группой без применения ИПост (рис. 1). Полученные нами результаты подтверждаются исследованиями, проведенными другими исследователями на крысах при окклюзии общих сонных артерий [19], а также с использованием 4-х сосудистой модели глобальной ишемии головного мозга [20]. Однако в перечисленных исследованиях авторами была выбрана другая продолжительность летальной (повреждающей) ишемии и другие протоколы ИПост. Наше исследование, проведенное на модели полной глобальной ишемии головного мозга у крыс, подтверждает наличие нейропротективного эффекта феномена ИПост. Воспроизводимость нейропротективного эффекта ИПост на различных экспериментальных моделях позволяет предположить, что защитный потенциал ИПост может быть использован для защиты головного мозга от ишемического и реперфузионного повреждения в ряде клинических ситуаций, когда применение общепринятой терапии оказывается неэффективным.

Иммуногистохимическим методом было выявлено различное количество Bax-позитивных нейронов в пирамидальном слое поля CA1 гиппокампа в различных экспериментальных группах. В группе ложнооперированных животных наблюдалась незначительная иммунореактивность проапоптотического белка Bax в пирамидных нейронах зоны CA1 гиппокампа. Этот белок локализовался в телах и отростках единичных нейронов поля CA1 гиппокампа (рис. 2). Аналогичные данные о наличии незначительной экспрессии белка Bax в пирамидных нейронах поля CA1 гиппокампа у ложнооперированных крыс были обнаружены при проведении Вестерн блоттинга [20] и иммуногистохимического окрашивания [21]. Через 48 часов после моделирования 10-минутной глобальной ишемии в зоне CA1 гиппокампа наблюдалось увеличение количества Bax-позитивных клеток, причем интенсивность экспрессии белка в раз-

личных нейронах существенно варьировала (рис. 2). Это может объясняться тем, что внутри зоны CA1 существует ранжирование клеток по уровню экспрессии гена Bax, и, следовательно, по их предрасположенности к ишемическому и реперфузионному повреждению. Известно, что продолжительная (летальная) ишемия/реперфузия головного мозга приводит к клеточной гибели путем апоптоза, с изменением активности белков, регулирующих апоптоз [10–13]. Так, в ряде исследований было обнаружено нарастание экспрессии проапоптотического белка Bax при ишемии/реперфузии головного мозга у грызунов [15, 19, 21]. Применение ИПост приводило к значительному снижению количества Bax-позитивных нейронов в зоне CA1 гиппокампа (рис. 2). Полученные нами результаты согласуются с результатами, полученными ранее при исследовании влияния ИПост на апоптоз нейронов на модели фокальной ишемии у крыс [15]. В данной работе было обнаружено уменьшение экспрессии проапототического белка Bax в нейронах пенумбры, т. е. зоны потенциально обратимого повреждения мозга. Однако необходимо отметить, что регионарный кровоток в зоне пенумбры может существенно варьировать, в то время как в нашем исследовании гиппокамп подвергался полной глобальной ишемии с последующим более сильным реперфузионным повреждением. В исследовании было впервые показано, что применение ИПост в виде коротких ишемических стимулов, выполненных в раннем реперфузионном периоде, способствует уменьшению количества Bax-позитивных нейронов ко вторым суткам реперфузионного периода. Следовательно, механизм нейропротективного эффекта ИПост при глобальной ишемии головного мозга может осуществляться путем подавления апоптоза нейронов.

Таким образом, в нашем исследовании было показано, что ИПост способствует выживаемости пирамидных нейронов и уменьшению числа Bax-позитивных нейронов в поле CA1 гиппокампа. Этот нейропротективный эффект, по всей вероятности, связан с ингибированием синтеза проапоптотического белка Bax в пирамидальных нейронах поля CA1.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ по государственной поддержке ведущих научных школ (НШ-2359.2012.7)

Литература

1. *Wardlaw J.M., von Kummer R., Farrall A.J. et al*. A large web-based observer reliability study of early ischemic signs on computed tomography. The Acute Cerebral CT Evaluation of Stroke Study (ACCESS) // PLoS One. – 2010. – Vol. 5. – P. 157.

2. *Van Bel F., Groenendaal F.* Long-term pharmacologic neuroprotection after birth asphyxia: Where do we stand? // Neonatology. – 2008. – V. 94. – P. 203–210.

3. *Mantz J., Degos V., Laigle C.* Recent advances in pharmacologic neuroprotection // Eur. J. Anaesth. – 2010. – Vol. 27. – P. 6–10.

4. *Chavez J.C., Hurko O., Barone F.C., Feuerstein G.Z.* Pharmacologic interventions for stroke: looking beyond the thrombolysis time window into the penumbra with biomarkers, not a stopwatch // Stroke J. Cereb. Circ. – 2009. –Vol. 40. – P. e558–e563.

5. *Durukan A., Tatlisumak T.* Preconditioning-induced ischemic tolerance: A window into endogenous gearing for cerebroprotection // Exp. Transl. Stroke Med. – 2010. – Vol. 2. – P. 2.

6. *Шляхто Е.В., Баранцевич Е.Р., Щербак Н.С., Галагудза М.М.* Молекулярные механизмы формирования ишемической толерантности головного мозга. Часть 1 // Вестник РАМН. – 2012. – № 6. – С. 42–50.

7. *Шляхто Е.В. Баранцевич Е.Р., Щербак Н.С., Галагудза М.М.* Молекулярные механизмы формирования ишемической толерантности головного мозга. Часть 2 // Вестник РАМН. – 2012. – № 7. – С. 20–29.

8. *Шляхто Е.В., Галагудза М.М., Сыренский А.В., Нифонтов Е.М.* Кардиопротективные эффекты феномена ишемического посткондиционирования миокарда // Кардиология. – 2005. – Т. 45. – № 7. – С. 44–48.

9. *Bopassa J.C., Ferrera R., Gateau-Roesch O.* PI3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning // Cardiovasc. Res. – 2006. – Vol. 69. – P. 178–185.

10. *Mattson M.P., Duan W., Pedersen W.A.* Neurodegenerative disorders and ischemic brain diseases // Apoptosis. – 2001. – Vol. 6. – P. 69–81.

11. *Kroemer G.* Mitochondrial control of apoptosis: an introduction // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2003. – Vol. 304. – P. 433–435.

12. *Lim M.L., Lum M.G., Hansen T.M.* On the release of cytochrome *c* from mitochondria during cell death signaling // J. Biomed. Sci. – 2002. – Vol. 9. – P. 488–506.

13. *Kuwana T., Mackey M.R., Perkins G.* Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane // Cell. – 2002. – Vol. 111. – P. 331–342.

14. *Щербак Н.С., Поповецкий М.А., Галагудза М.М. et al.* Нейропротективный эффект ишемического посткондиционирования при фокальной ишемии головного мозга у крыс // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2011. – Т. 39. – № 3. – С. 94–98.

15. *Xing B., Chen H., Zhang M. et al.* Ischemic postconditionin g inhibits apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat // Stroke. – 2008. –Vol. 39. – P. 2362–2369.

16. *Shcherbak N.S., Galagudza M.M., Kuzmenkov A.N. et al.* A new rat model of reversible global cerebral ischemia // Bull. Exp. Biol. Med. – 2012. – V. 152. – P. 656–658.

17. *Paxinos G., Watson Ch.* The rat brain in stereotaxic coordinates // N. Y. Academic Press. 1998.

18. *Kirino T.* Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia // Brain Res. – 1982. – Vol. 239. – P. 57–69.

19. *Nagy D., Kocsis K. Fuzik J. et al.* Kainate postconditioni ng restores LTP in ischemic hippocampal CA1: onset-dependent second pathophysiological stress // Neuropharmacology. – 2011. – Vol. 61. – P. 1026–1032.

20. *Ding Z.M., Wu B., Zhang W.Q. et al.* Neuroprotective effects of ischemic preconditioning and postconditioning on global brain ischemia in rats through the same effect on inhibition of apoptosis // Int. J. Mol. Sci. – 2012. – Vol. 13. – P. 6089–6101.

21. *Nemethova M., Danielisova V., Gottlieb M., Kravcukova P., Burda J.* Ischemic postconditioning in the rat hippocampus: mapping of proteins involved in reversal of delayed neuronal death // Arch. Ital. Biol. – 2010. – Vol. 148. – P. 23–32.

КУМУЛЯТИВНЫЕ ПОВРЕЖДАЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ ПОВТОРНЫХ ИШЕМИЧЕСКИХ СТИМУЛОВ НА СТРУКТУРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Н.С. Щербак

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия
Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

Щербак Наталия Сергеевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории неотложной кардиологии Института сердечно-сосудистых заболеваний СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, ведущий научный сотрудник лаборатории нанотехнологий ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341, ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» МЗ РФ, Институт сердечно-сосудистых заболеваний, ул. Л. Толстого, д. 6/8, Санкт-Петербург, Россия, 197022. E-mail: shcherbakns@yandex.ru (Щербак Наталия Сергеевна).

Резюме.
В обзоре представлены данные литературы и собственные результаты по изучению кумулятивных повреждающих эффектов коротких ишемических стимулов для различных структур головного мозга. Рассмотрены варианты использования различных протоколов и изучения кумулятивного эффекта ишемических стимулов. Впервые обобщены и подробно проанализированы кумулятивные эффекты коротких ишемических стимулов в сравнении с ишемическим прекондиционированием и ишемическим посткондиционированием.

Ключевые слова: ишемия-реперфузия, головной мозг, кумулятивный эффект

THE CUMULATIVE EFFECT OF REPEATED ISCHEMIC STIMULUS ON THE BRAIN STRUCTURES

N.S. Shcherbak

Saint-Petersburg Pavlov State Medical University, Saint-Petersburg, Russia
Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail.: shcherbakns@yandex.ru (Natalia S. Shcherbak – PhD, Advanced Scientific Scientific Research Laboratory of Nanotechnologies, Institute of Experimental Medicine).

Abstract.
The review presents the literature and our own results on the cumulative damaging effects of short ischemic stimulus for different brain structures. Consider using a variety of protocols and study the cumulative effect of the ischemic stimulus. For the first time summarized and detail analyzed the cumulative effects of short ischemic stimulus compared with ischemic preconditioning and ischemic postconditioning.

Key words: ischemia-reperfusion, the brain, the cumulative effect.

Статья поступила в редакцию 23.08.2012, принята к печати 01.09.2012.

Способность организма проявлять устойчивость к неблагоприятным факторам внешней среды, в том числе к ишемии, как к одному из наиболее сильных повреждающих воздействий, определяет витальный прогноз как целого организма, так и отдельных его структур. Устойчивость организма к патогенным факторам может существенным образом зависеть от видовой принадлежности, пола, возраста, от способности адаптироваться к неблагоприятным условиям, а также от степени подготовленности к возможному действию повреждающего фактора. Известно, что любое негативное воздействие, в том числе ишемия, в зависимости от продолжительнос-

ти и выраженности может приводить как к повреждающим, так и к протективным последствиям. Если ишемическое повреждение является сублетальным, т. е. не вызывающим гибели клеток, отмечается преобладание защитных механизмов, и последующее более продолжительное (тестовое) ишемическое состояние характеризуется лучшей переносимостью. Это явление известно как адаптация к повреждению. В историческом плане общие представления об адаптации сформировалось много веков назад, и нашли отражение еще в работах Парацельса, который отмечал, что «только доза делает яд ядом». Необходимо отметить, что механизмы адаптации организма заложены на генетическом уровне и закреплены в процессе эволюции. К таким механизмам эндогенной цитопротекции от ишемического и реперфузионного повреждения относят ишемическое прекондиционирование (ИПрек) и ишемическое посткондиционирование (ИПост). ИПрек было открыто Murry C.E. и соавт. в 1986 году при моделировании регионарной ишемии миокарда у собак [1]. Согласно современным представлениям, ИПрек подразумевает применение кратковременных ишемических стимулов, предшествующих длительной ишемии и способствующих мобилизации генетически детерминированных механизмов повышения устойчивости ткани к ишемии-реперфузии. Еще одним эндогенным способом защиты тканей от ишемического и реперфузионного повреждения является ИПост. Этот защитный феномен был открыт в 2003 г., когда было показано, что короткие повторные периоды ишемии миокарда по 30 секунд в периоде ранней реперфузии, выполненные после эпизода длительной ишемии, обеспечивают существенный кардиопротективный эффект [2]. Известно, что при ишемии значительной длительности наступают глубокие нарушения энергетического метаболизма клетки; однако последующее восстановление кровотока приводит к дополнительному повреждению на метаболическом, функциональном и морфологическом уровнях. Реперфузионное повреждение определяется тяжестью и продолжительностью ишемии [3]. Протективная концепция ИПост основывается на том, что ткани могут быть защищены от реперфузионного повреждения посредством коротких эпизодов ишемии и реперфузии, выполненных в раннем реперфузионном периоде после длительной ишемии. Лежащие в основе ИПрек и ИПост адаптивные ответы наблюдается у представителей самых разнообразных живых организмов от бактерий до млекопитающих [4].

В ряде клинических ситуаций применение общепринятой терапии оказывается неэффективным, поэтому поиск и разработка новых способов защиты тканей от ишемического и реперфузионного повреждения является актуальным. Механизмы эндогенных способов защиты миокарда в эксперименте изучены достаточно хорошо, и феномены ИПрек и ИПост уже сегодня находят применение в кардиохирургической практике [5]. Однако защитные феномены, повышающие устойчивость головного мозга к ишемическому и реперфузионному повреждению, в экспериментальных исследованиях изучены недостаточно, а существующие результаты зачастую противоречат друг другу. Во многом это связано с функциональными особенностями высокоорганизованной нервной ткани, со сложным строением головного мозга, с использованием различных экспериментальных моделей ишемии, а также с видовой принадлежностью объекта экспериментального исследования и индивидуальной устойчивостью к острой гипоксии и последующей реперфузии. Нейропротективный потенциал ИПост и ИПрек может найти свое применение при проведении операций на сосудах головы и шеи, в частности, при каротидной эндартерэктомии и стентировании сонных артерий, а также во время проведения кардиохирургических операций с применением экстракорпорального кровообращения. Известно, что гипоксическая энцефалопатия и связанные с ней нарушения когнитивных функций представляют серьезную проблему в кардиохирургической практике [6–10]. Только всестороннее исследование эндогенных способов защиты головного мозга в эксперименте позволит экстраполировать полученные результаты на человека и принять решение о возможности их применения в клинической практике.

Для проведения дальнейших экспериментальных работ и составления точных рекомендаций по проведению клинических исследований ИПрек и ИПост исследователи ставят вопросы, на которые необходимо иметь однозначные ответы [11, 12]. Один из таких вопросов, – каким должен быть протокол ИПрек и ИПост для обеспечения максимально выраженной нейропротекции? При разработке протокола следует учитывать такие переменные, как число применяемых ишемических стимулов, их длительность, интервал между нанесением стимулов и началом тестовой ишемии, вид стимулов, индуцирующих ИПреК [11, 12].

Экспериментальные протоколы применения ИПост и ИПрек авторами подбираются в процессе выполнения экспериментальной части исследования и далее публикуются только протоколы, в результате применения которых были получены протективные эффекты. Кумулятивные повреждающие эффекты использованных протоколов публикуются очень редко (табл.1). Чтобы максимально увеличить эффективность применяемого протокола и свести к минимуму риск возможного возникновения осложнений необходимо учитывать как протективные эффекты применения ишемических стимулов, так и возможные кумулятивные повреждающие эффекты.

Несмотря на достаточное количество исследований, остается малоизученной проблема неэффективного, кумулятивного или возможного повреждающего действия от применения прекондиционирующих стимулов или от стимулов, примененных в раннем периоде реперузии. Известно, что для различных органов и тканей необходимо неодинаковое количество прекондиционирующих стимулов. Так, для реализации эффекта прекондиционирования миокарда необходимо несколько ишемических стимулов, что было доказано во многих исследованиях с применением различных экспериментальных моделей [1, 13] в то время как, для прекондиционирования головного мозга необходим один ишемический стимул [11, 12, 14], а несколько приводят к выраженному повреждающему эффекту [15, 16]. Возможно, при моделировании нескольких прекондиционирующих стимулов, разделенных короткими периодами реперфузии, нервная ткань

становится более чувствительной к последующей продолжительной ишемии, т.е. наблюдается кумулятивный повреждающий эффект. Также можно предположить, что в основе таких различий лежат особенности метаболизма кардиомиоцитов и нейронов различных структур головного мозга, а также то, что, в отличие от клеток миокарда, для нейронов характерна отсроченная гибель [17]. На сегодняшний день механизмы повреждения нейронов, вызванного повторяющимися сублетальными ишемическими стимулами, остаются неизвестными. Существует небольшое количество экспериментальных исследований, показывающих кумулятивные эффекты применения ишемических стимулов (табл. 1). Далее представлен подробный анализ наиболее значимых исследований.

Так, в 1987 году в экспериментах на монгольских песчанках были изучены эффекты повторных эпизодов ишемии на ткань головного мозга при окклюзии общих сонных артерий [15]. Было установлено, что по прошествии 24 часов реперфузионного периода однократная 5-минутная окклюзия общих сонных артерий не приводит к гибели животных, 15-минутная ишемия приводит к гибели в 11% случаев, в то время как три эпизода 5-минутной окклюзии общих сонных артерий, разделенных 60-минутными эпизодами реперфузии, приводит к гибели 42% животных. При анализе регионарного мозгового кровотока было установлено, что кровоток при моделировании ишемии в коре мозга, в гиппокампе и стриатуме был равен нулю, в то время как в мозжечке он не отличался от значений, наблюдаемых в мозжечке у интактных животных. После однократного 5-минутного ишемического стимула наблюдалось быстрое восстановление кровотока, за которым следовал период 15-минутной гипоперфузии, при втором и третьем 5-минутном ишемическом стимуле восстановление постишемического кровотока наблюдалось медленнее, однако уровень гипоперфузии был одинаковым после всех трех эпизодов. Также было установлено, что применение трех эпизодов ишемии по 5-минут приводит к выраженному отеку при сравнении с другими экспериментальными группами. При морфологическом анализе структур головного мозга было установлено, что однократный эпизод ишемии приводит к повреждению пирамидных нейронов зоны CA1 гиппокампа, а в зоне CA2 наблюдалось «реактивное изменение» пирамидных нейронов [18]. При 15-минутной ишемии выраженному повреждению подвергались нейроны зоны гиппокампа CA1, CA4 и girus dentatus, а также нейроны третьего и пятого слоев коры головного мозга. При трех 5-минутных эпизодах ишемии выраженные повреждения наблюдались во всех слоях коры головного мозга, а также во всех зонах гиппокампа, включая girus dentatus. Три 5-минутных ишемических стимула, разделенных 60-минутным периодом реперфузии, приводили к большему отеку, чем однократный 15-минутный эпизод ишемии. Авторами было выдвинуто предположение, что гипоперфузия может играть ключевую роль в формировании кумулятивного эффекта, приводящего к более выраженным повреждениям при трех эпизодах 5-минутной ишемии, разделенных 60-минутными реперфузионными интервалами при сравнении с однократной 15-минутной ишемией [15]. Однако причинно-следственная связь между гипоперфузией и отеком позволяет сделать несколько иные предположения. С одной стороны, гипоперфузия может представлять микроциркуляторный ответ на некоторые сосудосуживающие факторы, развиваться в результате сужения сосудистого просвета из-за отека эндотелия, тромбоза, а отек может развиваться самостоятельно по другим независимым причинам. С другой стороны, отечная жидкость может скапливаться в паренхиме головного мозга и приводить к сдавлению

Таблица 1

Исследования, обнаружившие кумулятивные повреждающие эффекты ишемических стимулов на структуры головного мозга

№	Экспериментальная модель	Объект экспериментального исследования	Критерии оценки	Автор, год
1.	Билатеральная окклюзия общих сонных артерий	Песчанки монгольские *(Meriones unguiculatus)*	Морфологический анализ зон CA1, CA2, CA4, girus dentate гиппокампа, слоев коры головного мозга; оценка отека головного мозга	Tomida S. et al., 1987 [15]
2.	Билатеральная окклюзия общих сонных артерий	Песчанки монгольские *(Meriones unguiculatus)*	Анализ микроциркуляции гиппокампа, таламуса, некоторых областей коры головного мозга	Vass K. et al., 1988 [20]
3.	Модель 4-х сосудистой глобальной ишемии	Крысы линии *Wistar*	Морфологический анализ зоны CA1 гиппокампа	Nakano S. et al., 1989 [16]
4.	Билатеральная окклюзия общих сонных артерий	Песчанки монгольские *(Meriones unguiculatus)*	Морфологический анализ зон CA1, CA4 гиппокампа, стриатума, таламуса, некоторых областей коры головного мозга	Kato H., Kogure K. 1990 [32]; Kato H. et al., 1991 [33]
5.	Модель 4-х сосудистая глобальной ишемии	Крысы линии *Wistar*	Морфологический анализ зоны CA1 гиппокампа	Ohno M. Watanabe S. 1996 [21]
6.	Билатеральная окклюзия общих сонных артерий	Песчанки монгольские *(Meriones unguiculatus)*	Оценка неврологического дефицита по шкале оценки инсульта (stroke-index) McGraw	Щербак Н.С. и соавт. 2011 [26]
7.	Постоянная окклюзия общих сонных артерий у крыс	Крысы линии *Wistar*	Морфологический анализ зоны CA1 гиппокампа	Щербак Н.С. и соавт. 2012 [22]

сосудов микроциркуляторного русла и вследствие этого приводить к снижению мозгового кровотока. В анализируемом исследовании, при трех эпизодах ишемии к 24 часам реперфузии был обнаружен сильный отек, в то время как уровень мозгового кровотока был близок к нормальным значениям. Это не исключает возможности того, что именно отек играет ключевую роль в формировании кумулятивного эффекта, поскольку измерения кровотока могут отражать неоднородность циркуляции во всем головном мозге, а также повышение кровотока в артериолах и крупных сосудах компенсирующиеся, за счет резкого сокращения потока в капиллярной сети в результате ее сдавления извне. Таким образом, было выдвинуто предположение, что именно постишемическая гипоперфузия играет ключевую роль в развитии кумулятивного эффекта трех 5-минутных ишемических стимулов [15]. В 1988 году другими исследователями были продолжены исследования нарушений микроциркуляции и отека в различных отделах головного мозга монгольских песчанок в ответ на повторяющиеся ишемические стимулы [19]. Повторяющиеся 5-минутные эпизоды ишемии были разделены 3-минутным и 60-минутным интервалами реперфузии, с окончательной реперфузией длительностью 6 и 24 часов. Число перфузируемых капилляров, скорость кровотока и степень отека оценивали в различных областях коры головного мозга, в зонах CA1 и CA3 гиппокампа, таламусе и мозжечке. Было установлено, что повторяющиеся эпизоды ишемии приводят к постепенному нарастанию отека и постоянному прогрессивному уменьшению числа перфузируемых капилляров, причем каждый повторный эпизод ишемии приводит к перераспределению капилляров участников реперфузии. Также было обнаружено одновременное снижение количества перфузируемых капилляров и заметное расширение сосудов более крупного калибра. Именно такое перераспределение кровотока, по мнению авторов, не является питательным для тканей головного мозга, и развитие вторичной гипоксии может лежать в основе негативных кумулятивных эффектов повторяющихся ишемических стимулов [19].

В другом исследовании, на модели 4-х сосудистой глобальной ишемии головного мозга у крыс было исследовано влияние повторных сублетальных ишемических стимулов [16]. Были исследованы различные протоколы применения ишемических стимулов: 1) 3 эпизода по 3 минуты ишемии, разделенные 5-минутными эпизодами реперфузии; 2) 3 эпизода по 3 минуты ишемии, разделенные 60-минутными периодами реперфузии; 3) 3 эпизода по 3 минуты ишемии, разделенные 6-часовыми периодами реперфузии; 4) однократный 3-минутный ишемический эпизод; 5) однократный 9-минутный ишемический эпизод. Спустя 7 дней проводили морфологический анализ зоны CA1 гиппокампа. При анализе полученных данных было установлено, что однократная 3-минутная ишемия не приводит к значимому уменьшению числа жизнеспособных клеток в поле CA1 гиппокампа. Моделирование трех эпизодов по 3 минуты ишемии, разделенных часовыми реперфузионными интервалами приводят к более значимому повреждению зоны CA1, чем однократный 9-минутный ишемический эпизод, в то время как три эпизода по 3 минуты ишемии, разделенные 6-часовым реперфузионным интервалом демонстрируют умеренные повреждения зоны CA1 гиппокампа. Степень повреждения зоны CA1 у животных с моделированием трех эпизодов по 3 минуты ишемии с реперфузионными интервалами по 5 минут соответствует степени повреждения, наблюдаемой при однократной 9-минутной ишемии. Таким образом, в исследовании было показано, что применение сублетальной ишемии длительностью в 3 минуты может привести к серьезным повреждениям нейронов, если эти ишемические стимулы производятся с интервалом в один час. Было сделано предположение, что в реализации кумулятивного действия ишемических стимулов могут участвовать, как минимум, три механизма. Во-первых, может возникнуть постоянное нарушение микроциркулятроного русла, если последующий ишемический стимул моделируется в периоде гипоперфузии, следующем за предшествующим ишемическим стимулом. Во-вторых, изменение в кальциевой проводимости нейронов или изменение в чувствительности рецепторов в период реперфузии может обладать стимулирующим эффектом глутаматэргической эксайтотоксичности, индуцируемой во время повреждающей ишемии. Так, в исследовании было показано, что распределение повреждения нейронов песчанок, вызванное повторяющимися двухминутными стимулами приводит к гибели в тех районах, которые подвергаются глутаматэргической иннервации [19]. В третьих, возможно тромбирование артерий во время проведения повторного их клипирования [20]. Однако, третье предположение можно опровергнуть, поскольку повреждения в зоне CA1 носили равномерный характер, а при тромбировании артерий повреждения могли бы характеризоваться асимметричным проявлением.

Еще в одном исследовании [21], на 4-сосудистой модели глобальной ишемии у крыс изучали эффекты применения сублетального 5-минутного ишемического стимула, отделенного от повреждающей 10-минутной ишемии реперфузионным интервалом длительностью 2 часа или двое суток. Было установлено, что сублетальный ишемический стимул, выполненный за 2 часа до моделирования повреждающей ишемии, приводит к большей степени повреждения зоны CA1 гиппокампа, в то время как сублетальный стимул, выполненный за 2-е суток, обладает выраженным нейропротективным эффектом. На основе полученных результатов был сделан вывод, что именно продолжительность реперфузии, разделяющей сублетальный стимул и повреждающую ишемию, определяет возникновение дополнительного повреждения головного мозга или, напротив, нейропротективного ответа [21].

Результаты собственных исследований [22], направленных на изучение кумулятивных повреждающих эффектов ишемических стимулов, показали, что три 5-минутных эпизода ишемии/реперфузии, выполненные непосредственно перед постоянной билатеральной окклюзией общих сонных артерий у крыс линии *Wistar*, в острый период ишемии приводили к значимому умень-

шению жизнеспособных пирамидных нейронов зоны СА1 гиппокампа, а также к увеличению выраженности неврологического дефицита при сравнении с животными у которых не моделировались ишемические стимулы перед окклюзией общих сонных артерий. Также нами было установлено, что один 5-минутный ишемический эпизод, выполненный за 24 часа до моделирования ишемического повреждения, способствует формированию ишемической толерантности головного мозга при сравнении с ишемическим эпизодом, выполненным за 5 минут до повреждающей ишемии [22].

Однако делать окончательный вывод о том, что несколько сублетальных ишемических стимулов способствуют большей чувствительности мозговой ткани к последующей повреждающей (летальной) ишемии преждевременно. В двух исследованиях при моделировании ишемии головного мозга путем билатеральной окклюзии общих сонных артерий у мышей было установлено, что три эпизода ишемии длительностью одну минуту защищали головной мозг от последующей повреждающей ишемии [23, 24].

Также можно предположить, что реперфузионный интервал, разделяющий сублетальный стимул и повреждающую ишемию имеет определяющее значение, по которому дальше пойдет процесс: будет формироваться толерантность головного мозга или мозговая ткань станет более чувствительной. Эти заключения, ставят под сомнение существование ранней ишемической толерантности гловного мозга [14]. Принято считать, что ранняя толерантность или ранняя фаза ИПрек обусловлена изменениями внутриклеточного метаболизма, возникающими в результате посттрансляционной модификации регуляторных белков. Для реализации ранней фазы ИПрек необходимо от нескольких минут до нескольких часов. И напротив, отсроченное повышение толерантности к ишемии для своей реализации требует синтеза белков *de novo,* для чего необходим более продолжительный промежуток времени. Совсем недавно было установлено, что ИПрек приводит к изменению уровня экспрессии многих генов, которое, в свою очередь, приводит к нейропротективному фенотипу [14]. Вышеизложенные положения основываются на результатах исследований, доказывающих как раннюю, так и отстроченную ишемическую толерантность, однако результаты этих исследований часто являются противоречивыми [14, 21, 23–25]. Другим важным аспектом является то, что ишемические стимулы, выполненные в раннем реперфузионном периоде, также могут оказывать протективный эффект, известный как ИПост, или могут обладать кумулятивным эффектом, приводящим к увеличению повреждения. Исследования описывающие протоколы неуспешного применения или применения с отсутствием протективного эффекта ИПост единичны [26]. Так, в недавнем исследовании на монгольских песчанках, было обнаружено, что моделирование эпизодов реперфузии/ ишемии после 30-минутной глобальной ишемии мозга не оказывает нейропротективного эффекта независимо от длительности и количества постондиционирующих стимулов. Более того, моделирование серии 2-минутных эпизодов реперфузии/ишемии после продолжительной ишемии приводило к нарастанию проявлений неврологического дефицита и к увеличению летальности [26]. Известно, что эффективность применения ИПост ограничена жесткими временными рамками [27]. С другой стороны, общепринятого протокола индукции ИПост не существует, и каждый коллектив исследователей вырабатывает протокол, базируясь на собственных данных. В нашей работе применялись различные варианты протокола. Первый ишемический стимул после 30-минутной глобальной ишемии головного мозга монгольской песчанки применяли спустя 5, 10 и 30 секунд и 2 минуты, причем число ишемических стимулов было различным. Ни один из примененных протоколов ИПост не обладал нейропротективным действием. Более того, индекс неврологического дефицита возрастал во всех исследуемых группах пропорционально длительности постондиционирующих стимулов, увеличивался и показатель летальности. В наибольшей степени исследуемые показатели ухудшались в группе при применении протокола ИПост, где первый ишемический стимул применялся после 2 минут реперфузии и далее следовали 7 эпизодов реперфузии/ реокклюзии по 2 мин. Объяснением наблюдаемого нарастающего повреждающего эффекта при применении ИПост могут служить два обстоятельства: во-первых, время от момента окончания ишемии до начала первого ишемического стимула, возможно, играет ключевую роль при реализации защитного эффекта ИПост, во-вторых – суммарное дополнительное время ишемии само по себе может привносить дополнительный повреждающий ишемический эффект [26]. Так в исследовании [28] на модели постоянной фокальной ишемии с применением ИПост путем окклюзии двух общих сонных артерий у крыс было установлено, что применение стимулов ишемии/реперфузии после 3 минут реперфузии, следующей за ишемией, приводило к потере нейропротекторного действия ИПост [28]. В другом исследовании, при моделировании 10-минутной глобальной ишемии головного мозга у крыс было установлено, что протокол с применением ишемических стимулов после 60 секунд реокклюзии не обладал нейропротективным эффектом [29]. В исследовании на кроликах было обнаружено, что ИПост с 1 минутной реокклюзией после 1 минутной реперфузии защищает спинной мозг от ишемического повреждения [30]. В исследованиях на сердце было установлено: чем меньше животное и выше его основной обмен, тем короче должны быть ишемические стимулы. При этом на экспериментальных моделях, где используются более крупные животные, имеющие более низкую скорость метаболических процессов, необходимо использовать более продолжительные стимулы [31]. Можно предположить, что различные животные для достижения нейропротекторного эффекта нуждаются в различной стратегии применения реперфузии/реокклюзии.

Нейропротективные эффекты ИПрек и ИПост обладают большим нейропротективным потенциалом, однако остаются сложности для его применения в клинической практике. Во многом это связано с тем, что многие экспериментальные исследования проводятся на

грызунах-самцах, с применением методик, которые не всегда можно экстраполировать на человека в условия клинической практики. Отсутствие исследований, проводящих сравнение нескольких протоколов применения ишемических стимулов, с последующим анализом изменяющихся параметров на биохимическом, молекулярном и морфологическом уровнях не позволяет проводить научные поиски в рамках трансляционной медицины. Также необходимо отметить, что головной мозг состоит из сложноорганизованной нервной ткани, формирующей различные структуры, которые в свою очередь имеют различное филогенетическое происхождение, что может отражаться на различной их чувствительности к продолжительной ишемии/реперфузии, а также к кратковременным их эпизодам. Так, для более устойчивых к ишемии структур головного мозга, ишемический стимул может обладать протективным эффектом, а для других, наиболее уязвимых структур – напротив, повреждающим. Только всестороннее исследование эффектов от применения ишемических стимулов позволит сформировать протоколы ИПост и ИПрек для различных отделов головного мозга человека с учетом, возраста, пола, сопутствующей патологии, чтобы избежать возможного повреждающего действия и максимально использовать адаптивный потенциал нервной ткани, заложенный в ней в процессе эволюции.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ по государственной поддержке ведущих научных школ (НШ-2359.2012.7)

Литература

1. *Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A.* Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium // Circulation. – 1986. – Vol. 74, № 5. – P. 1124–1136.

2. *Zhao Z.Q., Corvera J.S., Halkos M.E. et al.* Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2003. – Vol. 285, № 2. – P. 579–588.

3. *Zhao H., Sapolsky R.M., Steinberg G.K.* Interrupting reperfusion as a stroke therapy: ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rats // J Cereb Blood Flow Metab. – 2006. – Vol. 26, № 9. – P. 1114–1121.

4. *Feder M.E., Hofmann G.E.* Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: volutionary and ecological physiology // Annu Rev. Physiol. – 1999. – Vol. 61. – P. 243–282.

5. *Rezkalla S.H., Kloner R.A.* Preconditioning in humans // Heart Fail Rev. – 2007. – Vol. 12, № 3-4. – P. 201–206.

6. *Гусев Е. И., Скворцова В.И.* Современные представления о лечении острого церебрального инсульта // Consilium medicum. – 2000. – № 2. – P. 60–65.

7. *Иванов С.В.* Психические расстройства связанные с хирургическими вмешательствами на открытом сердце // Психиатрия и психофармакология – 2005. – Vol. 7, № 3. – P. 1–10.

8. *Иванов С.В., Сыркин А.Л., Самушия М.А.* Расстройства личности в послеоперационном периоде аортокоронального шунтирования // Ж. неврол. психиатр., им. С.С. Корсакова. – 2004. – Vol. 104, № 12. – P. 10–17.

9. *Sotaniemi K.A.* Long-term neurologic outcome after cardiac operation // Ann Thorac Surg. – 1995. – Vol. 59, № 5. – P. 1336–1339.

10. *Spencer M.P.* Transcranial Doppler monitoring and causes of stroke from carotid endarterectomy // Stroke. – 1997. – Vol. 28. – P. 685–691.

11. *Шляхто Е.В. Баранцевич Е.Р., Щербак Н.С., Галагудза М.М.* Молекулярные механизмы формирования ишемической толерантности головного мозга. Часть 1 // Вестник РАМН. – 2012. – № 6. – P. 42–50.

12. *Шляхто Е.В. Баранцевич Е.Р., Щербак Н.С., Галагудза М.М.* Молекулярные механизмы формирования ишемической толерантности головного мозга. Часть 2 // Вестник РАМН. – 2012. – № 7. – P. 20–9.

13. *Щербак Н.С.* Оценка эффективности фармакологической и эндогенной миокардиальной цитопротекции при экспериментальной ишемии миокарда // Автореф. канд. наук. СПб. – 2006. – 20 с.

14. *Obrenovitch T. P.* Molecular physiology of preconditioning-induced brain tolerance to ischemia // Physiol Rev. – 2008. – Vol. 88, № 1. – P. 211–247.

15. *Tomida S., Nowak T.S. Jr. ,Vass K. et al.* Experimental model for repetitive ischemic attacks in the gerbil: the cumulative effect of repeated ischemic insults // J Cereb Blood Flow Metab. – 1987. – Vol. 7, № 6. – P. 773–782.

16. *Nakano S., Kato H., Kogure K.* Neuronal damage in the rat hippocampus in a new model of repeated reversible transient cerebral ischemia // Brain Res. – 1989. – Vol. 490, № 1. – P. 178–180.

17. *Kirino T.* Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia // Brain Res. – 1982. – Vol. 239. – P. 57–69.

18. *Ito U., Spatz M, Walker J.T., Klatzo I.* Experimental Cerebral ischemia in Mongolian gerbils. I: Light microscopic observations // Acta Neuropathol. – 1975. – Vol. 32. – P. 209–223.

19. *Kato H., Kogure K., Nakano S.* Neuronal damage following repeated ischemia in the gerbil // Brain Research. – 1989. – Vol. 479. – P. 366–370.

20. *Vass K., Tomida S., Hossmann K.A., et al.* Microvascular disturbances and edema formation after repetitive ischemia of gerbil brain // Acta Neuropathol. – 1988. – Vol. 75, № 3. – P. 288–294.

21. *Ohno M., Watanabe S.* Ischemic tolerance to memory impairment associated with hippocampal neuronal damage after transient cerebral ischemia in rats // Brain Res Bull. – 1996. – Vol. 40, № 3. – P. 229–236.

22. *Щербак Н.С., Выболдина Т.Ю., Галагудза М.М., и соавт.* Влияние раннего и позднего ишемического прекондиционирования головного мозга на выраженность повреждения нейронов гиппокампа и степень неврологического дефицита у крыс // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2012. – Vol. 98, № 8. – P. 62–71.

23. *Rehni A.K., Singh T.G., Kakkar T., Arora S.* Involvement of src-kinase activation in ischemic preconditioning induced protection of mouse brain // Life Sci. – 2011. – Vol. 88, № 19–20. – P. 825–829.

24. *Shin J.A., Park E.M., Choi J.S., et al.* Ischemic preconditioning-induced neuroprotection is associated with differential expression of IL-1beta and IL-1 receptor antagonist in the ischemic cortex // J Neuroimmunol. – 2009. – Vol. 217, № 1–2. – P. 14–19.

25. *Atochin D.N., Clark J., Demchenko I.T., et al.* Rapid cerebral ischemic preconditioning in mice deficient in endothelial and neuronal nitric oxide synthases // Stroke. – 2003. – Vol. 34, № 5. – P. 1299–1303.

26. *Щербак Н.С., Галагудза М.М., Нифонтов Е.М. и соавт.* Эффект ишемического постондиционирования при экспериментальной глобальной ишемии головного мозга // Артериальная гипертензия. – 2011. – Vol. 17, № 2. – P. 182–188.

27. *Boengler K., Buechert A., Heinen Y., et al.* Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice // Circ. Res. – 2008. – Vol. 102. – № 1. – P. 131–135.

28. *Gao X., Ren C., Zhao H.* Protective effects of ischemic postconditioning compared with gradual reperfusion or preconditioning // J Neurosci Res. – 2008. – Vol. 86, № 11. – P. 2505–2511.

29. *Wang J., Shen J., Gao Q. et al.* Ischemic Postconditioning Protects Against Global Cerebral Ischemia/Reperfusion-Induced Injury in Rats // Stroke. – 2008. – Vol. 39. – P. 983–990.

30. *Jiang X, Shi E, Nakajima Y, Sato S.* Postconditioning, a series of brief interruptions of early reperfusion, prevents neurologic injury after spinal cord ischemia // Ann Surg. – 2006. – Vol. 244. – P. 148–153.

31. *Vinten-Johansen J., Zhao Z.Q., Zatta A.J. et al.* Postconditioning--A new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury // Basic Res Cardiol. – 2005. – Vol. 100, № 4. – P. 295–310.

32. *Kato, H.; Kogure, K.* Neuronal damage following non-lethal but repeated cerebral ischemia in the gerbil // Acta Neuropathol. – 1990. – Vol. 79. – P. 494–500.

33. *Kato H., Liu Y., Araki T., Kogure K.* Temporal profile of the effects of pretreatment with brief cerebral ischemia on the neuronal damage following secondary ischemic insult in the gerbil: Cumulative damage and protective effects // Brain Res. – 1991. – Vol. 553. – P. 238–242.

ИДЕЯ ПРЕДВОЗДЕЙСТВИЯ В ОБЩЕПАТОЛОГИЧЕСКИХ И ЛЕЧЕБНЫХ ПРЕДСТАВЛЕНИЯХ С.П. БОТКИНА (К ВОПРОСУ ОБ ИСТОРИИ ФЕНОМЕНА ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ)

С.Г. Журавский

ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздравсоцразвития РФ, Санкт-Петербург, Россия
Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

Журавский Сергей Григорьевич – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник НИЛ нанотехнологий Института экспериментальной медицины ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздравсоцразвития РФ, ведущий научный сотрудник лаборатории слуха и речи НИЦ ГОУ ВПО «СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздравсоцразвития РФ.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. ГОУ ВПО «СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, ул. Льва Толстого, д. 6–8, Санкт-Петербург, Россия, 197022. E-mail: s.jour@mail.ru (Журавский Сергей Григорьевич).

Резюме.
Феномен защитного эффекта от воздействия повреждающих факторов при малых интенсивностях или дозах являлся объектом целенаправленного изучения и применения в богатой клинической практике Сергея Петровича Боткина (1832–1889). На примере архивного материала историй болезней членов российского императорского дома Романовых, эпистолярных и мемуарных источников нами представлено эмпирическое видение Боткиным феномена предвоздействия в условиях коморбидной патологии, в принципах реализации фармакодинамических эффектов лекарственных средств, методов физиотерапевтического и психотерапевтического лечения, психо-социальной гигиены.

Ключевые слова: С. П. Боткин, история изучения феномена прекондиционирования.

THE IDEA OF PRE-CONDITIONING IN THE SCIENTIFIC HERITAGE OF S.P. BOTKIN (HISTORY OF PRECONDITIONING PHENOMENON)

S.G. Zhuravskii

Saint-Petersburg Pavlov State Medical University, Saint-Petersburg, Russia
Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: s.jour@mail.ru (Sergey G. Zhuravskii – DM, researcher at the Laboratory of Nanotechnologies, Institute of Experimental Medicine, V.A. Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre; researcher at the Laboratory of Hearing and Speech, Research Centre, Saint-Petersburg State I.P. Pavlov Medical University).

Abstract.
The protective effect of certain injurious factors applied at low intensities or doses was specifically addressed and used in the clinical activities of Sergey Petrovitch Botkin (1832–1889). In this paper, the critical analysis of the clinical records of the members of Romanov dynasty, epistolary and memorial evidence is presented, as well as the empiric findings by Botkin on the phenomenon of pre-conditioning in comorbid states, pharmacodynamic effects of the drugs, physical and psychological therapy, psychological and social hygiene.

Key words: S.P. Botkin, preconditioning, history.

Статья поступила в редакцию: 01.09.2012, принята к печати 15.09.2012.

5 сентября нынешнего года исполняется 180 лет со дня рождения выдающегося русского ученого и врача, профессора академической терапевтической клиники Санкт-Петербургской Медико-Хирургической Академии Сергея Петровича Боткина – человека, чье имя навсегда стало символом отечественной медицины.

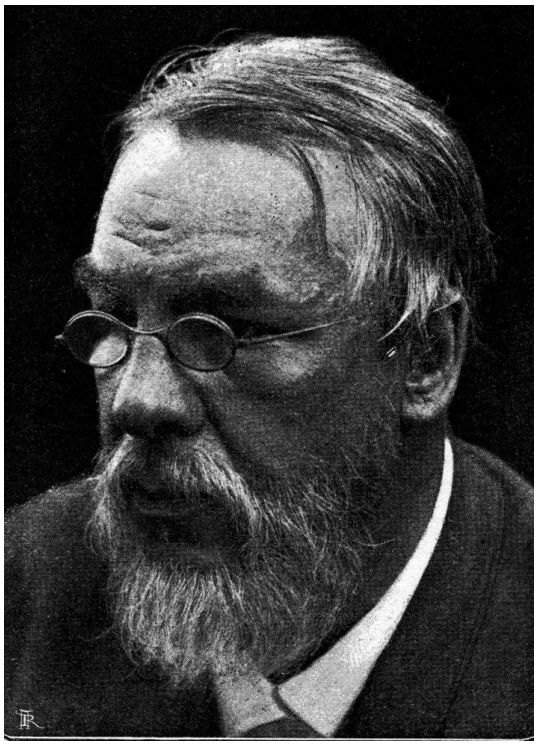
Главной заслугой С.П. Боткина справедливо считается создание первой в России русской терапевтической школы, давшей начало основным существующим медицинским специальностям (кардиологии, пульмонологии, фтизиатрии, дерматологии, инфекционным болезням, оториноларингологии), что позволяло говорить его сов-

ременникам, «что Боткина, как врача, знала и чтила вся Россия» [1; С. 5]. Клиническое наследие С.П. Боткина и спустя почти два века остается тем научным «кладезем знаний» [2], из которого продолжают черпать идеи последующие поколения врачей. Эмпирическое видение Боткиным актуальных вопросов медицины и сегодня очаровывает тонкой наблюдательностью, оригинальностью клинических примеров, неустаревающей логикой рассуждений.

Характерной особенностью боткинской терапевтической школы была сдержанность в назначениях [3]: «Как терапевт, Сергей Петрович не был вообще поклонником энергических мероприятий и отличался мудрой осторожностью» [1; С. 56]. При этом, ему не без успеха удавалось проводить курацию главных хронических заболеваний (туберкулеза, сахарного диабета, хронического бронхита, артериальной гипертонии, нарушений менструального цикла), поддерживать так обсуждаемое в наши дни «качество жизни пациентов» в условиях хронической патологии.

Что же обеспечивало достойные результаты лечения по Боткину, из чего складывался терапевтический потенциал доктора середины-конца XIX столетия? – Здесь мы видим и классику фармакотерапии XIX века (дигиталис, ландыш, адонис, мышьяк, хинна, ревень, карболовая кислота), и продуманное лечебное питание (мясные бульоны, коровье молоко, кумыс, чернослив и пр.), и детальную осведомленность о дифференцированных лечебных свойствах минеральных источников, климатических курортов и т. д. Часть этих способов оказывала свои эффекты посредством фармакодинамического воздействия (заместительного, угнетающего, стимулирующего, регулирующего и пр. свойств), другая – рефлекторным путем (кровопускания, массаж, гидро- и бальнеотерапия). Анализ принципов действия и тех, и других показывает, что развитие их эффектов в ряде случаев происходит через опосредованные механизмы – реакции, запускающие естественные неспецифические защитные процессы. Одним из них является эффект от воздействия малых доз или интенсивностей различных повреждающих факторов, который в современном понимании и терминологии называется феноменом предвоздействия и представляется двумя патофизиологическими вариантами: прекондиционированием (ПреК) и посткондиционированием (ПостК).

Интерес к боткинскому видению феномена предвоздействия определяется исключительно клиническим его характером – в том смысле, как понимал это сам Сергей Петрович, – в его индивидуальной ориентированности для каждого клинического случая, в дифференцированном подходе с учетом особенностей патологического процесса у конкретного пациента, – т. е. во всем том, в чем современная клиническая медицина продолжает ощущать существенные недостатки. Имея сегодня высоконаучную экспериментальную базу для понимания условий и механизмов прекондиционирования, фундаментальная медицина столь далеко ушла от своих клинических корней, что теперь уже требуется не меньше осознанных усилий, чтобы из прочно сложившегося за годы изучения «вирховского» восприятия (клеточного и органного) защитного феномена сформировать терапевтическую стратегию для уровня целого организма. Отмеченное обстоятельство и определяет ценность современного прочтения Боткина, – в возможности увидеть ход мысли человека, впервые обозначающего патологическое явление лишь на основании анализа фактологического материала, не обладая теоретическим и понятийным аппаратом для его обсуждения.



С.П. Боткин в последние годы жизни.
(фотография из монографии Н.И. Соколова «История болезни Сергея Петровича Боткина» – СПб., 1890).
Одна из копий этого снимка была подарена Сергеем Петровичем Н.А. Белоголовому и приведена последним в его книге «Воспоминания и другие статьи» (СПб, 1897). Под фотографией имеется подпись «24 октября 1887 г.», с указанием, что она сделана супругой С.П. Боткина – Екатериной Алексеевной, прекрасно освоившей модное в конце XIX века фотоискусство (о чем известно по воспоминаниям К.М. Салтыкова [26]

Один из студентов, слушавших лекции Боткина, много лет спустя метафорично писал о них в своих воспоминаниях: «С.П. Боткин <…> умел все это талантливо проделать перед слушателями, и перед их глазами, так сказать, *происходило в мозгу профессора пищеварение собираемых им фактов и получение окончательного удобовсасываемого продукта*, т.е. вывода, с какой болезнью имеешь дело и как надо ее лечить» [4; Л. 34]. В раскрытии перед читателем самого процесса и конечного продукта «боткинского пищеварения фактов» и есть цель настоящей работы.

Оговоримся сразу, что, не претендуя на осмысление всего научного наследия С.П. Боткина, мы считаем своей задачей представить его видение и терапевтическое применение защитного феномена предвоздействия.

Самого термина «предвоздействие», равно как и какого-либо схожего по смыслу понятия, обозначающего этот защитный физиологический механизм, в середине – второй половине XIX века не существовало, поскольку отсутствовала сама теория защитного свойства воздей-

ствия малых интенсивностей потенциально повреждающих стимулов.

Уместным примером тому, что такие феномены наблюдались, но не осознавались, может служить история, приведенная в воспоминаниях современника С.П. Боткина, врача С.Я. Елпатьевского: «Был <…> случай, когда от сыпно-тифозного мальчика заразился лежавший в той же каморке больной с огромными язвами третичного сифилиса, но и он поправился, и *даже оказался в выигрыше* – огромные упорные язвы высохли в несколько дней и по= сле тифа открылись в гораздо меньшем размере, и больной как-то особенно быстро стал поправляться» [5; С. 18].

Боткин, пожалуй, был первым, кто стал анализировать подобные явления, часто встречавшиеся в условиях естественного течения различных «инфекционных форм», не стесненных антибактериальной терапией. Так, Боткин описывает особенности клинических вариантов патологии, зависящие от типа манифеста: нефрит с почечной недостаточностью, развивающийся в картине многих болезней, приводит к затуханию лихорадки и кожно-суставных реакций. В этом случае тяжелый нефрит или кардит в начале заболевания, приобретая, в сущности, свойство предвоздействующего условия, не позволяет развиваться лихорадке и аллергическим реакциям, характерных для этих нозологических форм. Академик Е.М. Тареев, перечисляя вехи боткинских достижений, образно называет это явление «четвертым законом Боткина» [2]. Только в последние годы это наблюдение Боткина стало объектом прицельного исследования при различных вариантах ишемического прекондиционирования в клинике (транзиторная ишемическая атака, нестабильная стенокардия, болевая стенокардия напряжения) [6–9].

Самыми же яркими боткинскими примерами предвоздействия остаются классические наблюдения межпатогенного антагонизма в условиях инфекционного коморбизма, в свою очередь, названные «седьмым законом Боткина» [2]. Эти явления были замечены Боткиным при сравнении ряда клинических параметров, в частности, температурных диаграмм лихорадящих больных при моноинфекциях и случаях одновременного течения двух инфекций. В ставшем хрестоматийным «Курсе клиники внутренних болезней» [10] без труда находятся строки, иллюстрирующие этот феномен особенностями клинической картины сыпного тифа:

- «В чистых случаях сыпного тифа потов обыкновенно не бывает; мы замечали их лишь только в тех случаях сыпного тифа, в которых он протекал вместе с возвратной горячкой» (С. 108);
- «Одновременное присутствие возвратной горячки при сыпном тифе значительно способствует уменьшению тифознаго состояния и жгучаго жара кожи» (С. 89);
- «В чистых сыпных тифах оно <тифозное состояние нервной системы> редко отсутствует; и только при осложнении сыпного тифа возвратной горячкой оно бывает чрезвычайно незначительно; иногда такие больные оканчивают всю форму болезни, не бредив ни одного дня» (С. 124).

Подобные черты патологий при коморбидных процессах отмечались Боткиным и в других условиях: при сочетании туберкулезного плеврита с брюшным тифом, диареей, хроническом воспалении почек с лихорадками не почечного происхождения [2]. Клинические особенности, приобретаемые при совместном течении двух инфекционных форм (сыпного и возвратного тифов, малярии и сыпного тифа, тифа и оспы, тифа и кори и пр.), становились самыми обсуждаемыми вопросами на заседаниях Общества русских врачей в Петербурге в то время, когда Сергей Петрович Боткин был его председателем (1879–1889).

В отделе рукописей РНБ хранится практически неизвестный читателю и науке уникальный документ – «Дневник» [11], принадлежащий перу С.П. Боткина и датируемый 1877–1889 гг. Источник этот представляет собой подробный и единственный автограф, свидетельствующий о службе Боткина лейб-медиком императорской четы – Александра II и его супруги, императрицы Марии Александровны. В этой – длиною в десятилетие – истории болезни, на 315 листах с трудно читаемым почерком, обнаруживаются авторские описания эмпирических представлений феномена предвоздействия, связанные с курацией членов августейшей семьи.

Так, составляя эпикриз болезни императрицы, Боткин размышляет: «… не оставляло никакого сомнения, что одновременно с плевритом протекала и инфекционная тифозная форма<,> но *без резких характеризующих симптомов ту или другую правильную форму тифа*» [11; Л. 115 об., Л.116, запись от 11 декабря 1879 г.].

В этом же документе читаем: «Хроническия воспалительныя процессы почек, как показывают опыт и наблюдения последняго времени, составляют одно из условий задерживающих повышение температуры при некоторых причинах вызывающих лихорадку» [11; Л. 125 об., запись от 9 декабря 1879 г.].

Анализ фармакологического действия лекарственных средств, которыми пользовался С.П. Боткин [3], показывает, что те из них, которые являлись ядами или имели токсические свойства, реализовывали механизмы своего действия, применяясь в микродозах, также по принципу предвоздействия. К примеру, назначение популярной в рецептуре С.П. Боткина наперстянки (Digitalis) проводилось на основании представлений о ее фармакологическом действии, разработанных Traube еще в 1851 году:

«1. Малые дозы digitalis повышают артериальное давление и замедляют сердцебиение.

2. Большие дозы понижают давление и замедляют сердцебиение.

3. Очень большие учащают сердцебиение и еще значительнее понижают артериальное давление» [12].

Лекарственные вещества с подобным характером органотоксичности и при одновременном лечебном эффекте, тропном к этим же органам, по сути, могут рассматриваться фармакологическими индукторами феномена предвоздействия.

Этот же принцип «малых доз» оказывается в основе фармакодинамики другого лекарственного средства С.П. Боткина, – мышьяка, смертельного яда, однако, с успехом применявшегося в медицине со времен Гиппократа. Наблюдения за улучшением состояния здоровья от микродоз мышьячных солей, попадавших в организм при немедицинских обстоятельствах, являлись эмпирическим основанием для внесения препарата в европейские фармакопеи в качестве тонизирующего средства

при физических истощениях после длительно текущих инфекционных заболеваний, кровопотерь, а также в виде специфического лекарства для лечения хронической малярии, кожных болезней и пр. («азиатские пилюли» per os, подкожные инъекции) [13;].

В боткинских рецептурных прописях мышьяк был частым компонентом пилюль для лечения его главного пациента – императрицы Марии Александровны, тяжело болевшей чахоточной формой туберкулеза. В одном из заключений Сергея Петровича мы встретим следующую запись: «Императрица чувствует себя лучше, белка нет, мокрота изменила несколько свой характер, зеленый цвет ея не так резок, спит хорошо, задыхается меньше. После *мышьяка* силы очевидно стали лучше» [11; Л. 61 об., запись от 15 июня 1879 г.].

Мышьяк использовался и в терапии императора Александра II. С.П. Боткин так описывает состояние монарха весной 1879 г., в период затянувшегося двухмесячного обострения хронического бронхита: «Здоровье Государя в сущности за это время улучшилось, кашель уменьшился, жалобы на головную боль, слабость головы, безсонницы, сердцебиение – уменьшились, лицо стало гораздо лучше, не худеет; за всю зиму не было лихорадочных движений; белок из мочи совершенно исчез более полутора месяцев<,> кушает хорошо; улучшение наступило довольно резко *при употреблении мышьяка* и kali<um> bromate» [11; Л. 51., запись от 22 марта 1879 г.].

Приверженность к этому средству сохраняется у Боткина на протяжении всей его клинической практики. Так, 10 лет спустя, в начале января 1889 г., при консультации уже другой императрицы, – Марии Федоровны, супруги императора Александра III, Сергей Петрович назначает арсеникум для лечения обильных месячных кровопотерь и вскоре отмечает его положительные результаты: «С Императрицей все шло благополучно, в течение месяца принимала железо с мышьяком, ни на что особо не жаловалась» [11; Л. 213 об., запись от 16 февраля 1889 г.].

В русле обсуждаемого принципа «малых доз повреждающего воздействия» можно рассматривать фармакодинамические механизмы и других препаратов фармакопеи времен Боткина: йода, железа, серы, ртути, фосфора, камфары, наперстянки, сенны, хины и др. [13]. И если фармакологическая природа воздействующих факторов становится условием получения специфичной органотропности, то физический характер индуктора (холодной воды, изменений условий окружающей среды в период курортного лечения), напротив, способствует получению общих неспецифических реакций организма.

Наблюдением такого рода защитного состояния может служить описываемая Сергеем Петровичем динамика сердечно-легочной недостаточности у императрицы Марии Александровны в момент ее железнодорожного переезда из Царского Села в Югенгейм: «Переезд в высшей степени удачный, уже на другой день выезда Императрица чувствовала заметное облегчение дыхания, которое постепенно и улучшалось во время путешествия» [11; Л. 70., запись от 3 августа 1879 г.]. На то, что это изменение вызвано именно эффектом предвоздействия, указывает последовавшее довольно скоро угасание достигнутого эффекта, что в нашем контексте можно объяснить отсутствием очередного индукционного стимула, требующегося для поддержания защитного состояния: «Улучшение однакоже держалось недолго в том блестящем виде, как первые дни приезда. Недели через полторы или две начались сонливости, усилился кашель, стало выделяться мокроты больше и с примесью эластических волокон, появились головныя боли и дело поправления остановилось» [11; Л. 163 об., Л. 164; запись от 14 июня 1880 г.].

Анализируя предложенную Боткиным тактику климатического лечения легочного туберкулеза у императрицы, следует согласиться, что сравнительно теплые и мягкие зимы в центральной Европе, несомненно, способствовали устранению внешних факторов прогрессии заболевания; однако, происходящая со временем акклиматизация к «оранжерейным условиям», лишала организм тонизирующего стимула «внешнего воздействия». Последний можно рассматривать условием поддержания активности защитных эндогенных механизмов эустресса (суммы симпатоадреналовых, гормональных, иммунологических и др. реакций), по сути, выполнявшим при этом роль индуктора предвоздействия на уровне целого организма.

Клиническую эффективность другого известного Боткину способа немедикаментозного воздействия – гидротерапии – можно также объяснять реализацией эффекта предвоздействия в клинических условиях. На страницах «Дневника» неоднократно приводятся случаи обливания холодной водой, ставшие с детских лет привычными для Александра II. Первое свидетельство этому в «Дневнике» относится к периоду русско-турецкой кампании 1877–1878 гг., когда Боткин, наблюдая императора, только что перенесшего малярийный криз и острую кишечную инфекцию (предположительно брюшной тиф), записывает: «С 5го числа Его Величество начал принимать пилюли с мышьяком и хинином, что по-видимому хорошо переносится и резко увеличивает апетит и силы. С 6го числа Е.<го> В.<еличество> *начал снова обливаться*» [11; Л. 2, запись сделана в Плоешти 7 июня 1877 г.]. Вполне возможно, что именно этот эпизод самолечения императора в походных условиях натолкнул Боткина применить в одном из военно-временных госпиталей для лечения лихорадящих больных тифом солдат необычную форму гидротерапии – погружением в воду на носилках в реку Янтра [15; С. 62]. В тоже время отметим, что состояние лихорадки на пике тифа и физическое истощение вследствие малярийных кризов представляют собой патогенетически различные фоновые состояния для применения холодной воды по принципу посткондиционирования.

Обращает внимание, что сделанные в этом случае медикаментозные назначения (мышьяк и хинин) также выступают средствами, реализующими принцип фармакологического варианта посткондиционирования.

Еще один эпизод обливаний отмечен Боткиным по поводу жалоб Александра II, видимо, связанных с ситуацией с его правой рукой: «На этой неделе Государь начал обливаться <водой> в 20 гр<адусов> Р с одним фунтом соли, вслед за чем по временам исчезал голос, <…> лицом свеж, только руки холоднее обыкновеннаго, доволен» [11; Л. 39, запись от 11 мая 1878 г.]. Рекомендуя первоначально отложить подобное лечение, лейб-медик

позднее отмечает приносимую им пользу: «Г-<осуда>рь сегодня все таки обливался; рука болит меньше, <и> вчера на линейном параде мог ехать с саблей в руке» [11; Л. 39, запись от 14 мая 1878 г.].

Последнюю запись в «Дневнике» об обливаниях Боткин делает еще через год – по возвращении августейшего семейства из Ливадии: «Г-<осуда>рь начал обливания в 22 гр.<адуса> с прибавкою 2 фунтов соли, переносил <их> хорошо и приходил в восторг от удовольствия» [11; Л. 58, Л. 59 об., запись от 31 мая 1879 г.].

Не подлежит сомнению, что, наблюдая за состоянием здоровья своего венценосного пациента, Боткин не мог не задумываться о механизмах действия этого «вызывающего восторг» у далеко немолодого мужчины средства. Эффект воздействия холодной воды в условиях «возрастных» болезней Боткин продолжит наблюдать и анализировать спустя несколько лет уже на самом себе, и это при том, что, судя по письму к Н.А. Белоголовому, «прежде в молодые годы <холодную воду> не переносил и не без страха решился удовлетворить моему любопытству» [17; Л. 8, письмо от 20 октября 1887 г. из Биарриц; №24].

История изучения Боткиным влияния гидротерапии на организм при хронической сердечной недостаточности известна исключительно по материалам переписки с другом, коллегой и впоследствии его первым биографом – Н.А. Белоголовым. Подавляющая часть этих писем до сих пор остается малоизвестным архивным материалом [17].

После перенесенного зимой 1882 года тяжелого сердечного приступа, когда Боткин был вынужден трое суток неподвижно провести в кресле [18], что уже позднее было расценено как острый инфаркт миокарда [19], Сергей Петрович начал отмечать постепенное нарастание одышки при физической нагрузке. Анализируя в этой ситуации на самом себе действие от применявшихся в подобных случаях наперстянки, абсолютной молочной диеты, снижения веса, исключения алкоголя и прекращения курения Боткин отмечает наибольшее улучшение лишь от проведения обливаний холодной водой: «Запасшись силами в деревне и особенно удачно применяя к себе холодную воду, я чувствовал все время себя отлично и мог примерно работать» [17; Л. 18, письмо от 26 декабря 1885 г. из С.-Петербурга; № 18]. Со временем обливания становятся уже привычными для Боткина: «Чувствую я себя гораздо лучше особенно здесь в Финляндии после того, как начал обливаться холодной водой, двигаюсь совершенно свободно без всяких ощущений даже после обеда» [17; Л. 13 об., письмо от 16 июля 1887 г. из Культиллы; № 26].

Приведем наиболее полное боткинское сообщение по этому поводу: «Я заменил купанье в море холодными ванными из морской воды, переносил их прекрасно, кашель не усиливался, но все таки самоощущение было не важное, в гору ходить было тяжело, спал все по прежнему. Переехав в Биарриц я снова попробовал выкупаться в море в potr viena и в тихую погоду и перенес недурно, но все таки была маленькая одышка, которая напомнила мне St. J. de L. и я решился снова начать холодныя ванны в заведении, но любопытства ради попробовал душ из холодной морской воды одновременно с дождем <…> на этот же раз я не только перенес совершенно хорошо всю эту процедуру, но выйдя из заведения *я почувствовал себя другим человеком, с новой грудью, с новыми силами. Я не ходил, а летал, шел ли в гору или под гору – все равно. Более блистательного действия на себе я еще не видал ни от одного средства. Не могу Вам передать того чувства счастья, когда я стал чувствовать себя освобождающимся от каких то пудов, которые меня давили и немилосердно душили*. С тех пор я ежедневно беру души, благотворное влияние которых все еще продолжается; кашель мой, немилосердно мучивший меня с Апреля месяца, почти прекратился, ночи я обычно сплю, ем с необычайным апетитом, потерял мою прежнюю чувствительность к холоду и одышка при ходьбе в гору уменьшилась в значительной степени; с пустым желудком я хожу совершенно свободно, но теперь могу ходить и после сытного обеда даже» [17; Л. 7, Л. 8, письмо от 20 октября 1887 г., написанное в Биаррице; № 24].

Отметим, что речь идет о 55-летнем мужчине, клиническое состояние которого сегодня можно было представить следующим образом:

Основной диагноз: Ишемическая болезнь сердца. Стенокардия напряжения. Постинфарктный кардиосклероз (повторные инфаркты миокарда 1882 и 1886 гг.). Аневризма левого желудочка. Внутрижелудочковый тромб.

Сопутствующий диагноз: Хроническая обструктивная болезнь легких III ст. («бронхит курильщика»). Хроническое легочное сердце. Желчно-каменная болезнь (множественные камни желчного пузыря, вентильный камень ductus cysticus?). Ожирение II ст. Сахарный диабет т. II?

Осложнения: Дыхательная недостаточность III ст. ? Хроническая сердечная недостаточность, соответствующая III–IV ф. к. по NYHA или недостаточности кровообращения II Б. Рецидивирующая тромбоэмболия легочной артерии.

Самонаблюдения Боткина о влиянии холодной воды на организм пожилого человека в условиях течения хронической сердечной недостаточности, по-видимому, можно считать первым целенаправленным изучением эффекта посткондиционирования в клинике. Весьма вероятно, что своими наблюдениями об эффектах гидротерапии Боткин делился в последних лекциях, которые были посвящены физиологии и патологии старения и читались им для врачей Санкт-Петербургских городских богаделен. К великому сожалению, этот цикл лекций не был записан ни одним из его учеников [20].

Эквивалент биологическому варианту предвоздействия эмпирически чувствовался С.П. Боткиным и в психофизиологической сфере человека. Так, защитный феномен в форме ПостК становится основой психотерапевтических рекомендаций при случае аффективной невротической патологии. Об этом свидетельствуют воспоминания одной из пациенток С.П. Боткина – супруги его ученика, в будущем академика И.П. Павлова – Серафимы Васильевны Павловой (1859-1947). Поводом для консультации явилась «непреодолимая душевная тоска», у этой еще не так давно чрезвычайно активной 24-летней женщины, вызванная ее глубоким переживанием смерти сына-первенца. В общении с пациенткой Боткин целенаправленно ищет те моменты, которые явно противоречат

ее сформировавшемуся образу жизни и принципиально неприемлемы по нравственным соображениям: «Скажите, вы любите молоко? <...> Вы южанка, наверное, привыкли пить за обедом? <…> Играете ли вы в карты? <…> Читали ли вы Дюма и еще такую прекрасную вещь, как «Рокамболь? <...>», и получив отрицательные утверждения: « Что Вы, Сергей Петрович, никогда в жизни! <…> Да что Вы обо мне думаете, Сергей Петрович? Ведь я недавно кончила курсы, и мы не привыкли интересоваться такими пустяками!», дает совершенно неожиданные рекомендации: «Вот и прекрасно. Значит, вы будете пить сначала полстакана молока в день, потом стакан. Так вы поднимитесь до восьми стаканов в день, а затем спуститесь обратно до полстакана. В каждый стакан будете вливать по чайной ложке хорошего, крепкого коньяка <…>. Дальше, после обеда вы будете лежать час-полтора. Будете каждый день играть в винт, <…> и будете читать Дюма. И ежедневно гулять во всякую погоду не меньше часа. Да, еще будете на ночь обтираться комнатной водой и растираться толстой крестьянской простыней». Такое индивидуально подобранное воздействие на пациенку – выпускницу Женских педагогических курсов, одержимую идеей народничества, женщину эмансипированную, как сказали бы мы сегодня, – становится ятрогенным способом раздражения психики. Вызывающие, на первый взгляд, недоумение, но, вне всякого сомнения, основанные на глубоком многолетнем клиническом опыте и эмпирическом чутье советы Боткина действительно приводят к выздоровлению С.В. Павловой: «… исполняя точно все его советы, я была через три месяца здоровой женщиной» [21; С. 123–124].

Идея предвоздействия в форме принципа общественной, нравственной гигиены (в виде всеобщего созидательного труда) была особенно популярной в сознании наиболее передовой части общества второй половины XIX века. Поэт Н.А. Некрасов, современник и близкий знакомый Боткина, к слову, посвятивший ему главу одной из самых известных своих поэм «Кому на Руси жить хорошо», в стихотворном цикле «О погоде» («До сумерек», 1865 г.) рисует интуитивное писательское восприятие принципа предвоздействия на примере сформированного годами психофизического стереотипа существования человека в окружающей среде. В некрасовских строках, в ответ на сочувствие пожилому мужчине, типографскому рассыльному Минаю («Да, пора бы тебе на покой…») звучит поэтическое воплощение идеи предвоздействия в образе жизни героя:

«…То-то нет! Говорили мне многие,
Даже доктор (в тридцатом году
Я носил к нему «Курс Патологии»):
«Жить тебе, пока ты на ходу!»
И ведь точно: сильней нездоровится,
Коли в праздник ходьба остановится:
Ноет спинушка, жилы ведет!
Я хожу уж полвека без малого,
Человека такого усталого
Не держи – пусть идет!» [22; С.172].

Уже будучи тяжело больным и испытывающим значительные физические трудности, Сергей Петрович однозначно определял для себя животворную энергию психо-физического эффекта своей профессиональной деятельности. В одном из последних писем Белоголовому Боткин делится, насколько для его физического состояния важно активное продолжение своего дела: «Мой учебный сезон я провел довольно хорошо, окончив лекции я даже не чувствовал усталости; заскучал только экзаменами, которые начал с начала пятой недели и вел до конца шестой; бывало <приедешь в> пол день в клинику, *простошишь лекцию и освежишься иногда на целый день*, а когда вместо лекции приходилось экзаменовать, то чувствовал только одну усталость; еще первыя группы студентов, дававшия хорошие ответы выносились порядочно, но когда пошли оборыши, то я стал чувствовать более чем усталость, и какое-то угнетение » [17; Л. 3 об., Л. 4, письмо от 6 апреля 1889 г.; № 30].

За два года до смерти Боткина, в конце 1887 г., Н.А. Белоголовый вспоминал реакцию больного друга на совет оставить преподавательские занятия и провести зиму в Ницце: «… он даже побледнел, замахал решительно руками и, задыхаясь от волнения, вскричал: «Ну, как ты можешь подать мне такой совет? Да разве ты не понимаешь, что клиника – все для меня и что без нее я жить не смогу? Я тогда совсем пропащий человек!» [23; Гл. III, С. 2].

Влияние психического стимула эмоционально иного характера на творческую активность Боткин наблюдал в семейной жизни своего товарища, пациента и высоко ценимого писателя – М.Е. Салтыкова-Щедрина. Боткин анализирует ставшую привычной дискомфортную связь между супругами, вызванную столкновением глубокого психического мироустройства Салтыкова-Щедрина с часто легкомысленной и взбалмашной натурой Елизаветы Аполлоновны. Подобный диссонанс во взаимоотношениях продолжался около 30 лет, вплоть до смерти писателя. Наблюдая семью Салтыковых, Сергей Петрович, приходит к удивительному заключению, что подобное отношение супруги оказывало позитивное (!) влияние на творчество писателя («как фосфор стимулировала мозг Михаила Евграфовича» [24]).

Сегодня феномен предвоздействия понимается наукой как неспецифический биологический механизм защиты, связанный с индуцированной способностью ткани или органа переносить тяжелое повреждение в результате влияния стрессового стимула малой интенсивности. В то же время, достижение лечебного эффекта под влиянием малоинтенсивного, но потенциально повреждающего фактора, издавна выступало одной из терапевтических стратегий лечения. Объяснение этому нам видится в неком эволюционном свойстве человека интуитивно чувствовать возможные пути достижения естественных защитных состояний.

В научном наследии С.П. Боткина механизм предвоздействия, являвшийся до этого лишь эмпирической идеей лечения в период господства гуморальной теории патологии, впервые становится объектом целенаправленного клинического анализа в области общей патологии и частной терапии. Больше того, физическая индукция эндогенного защитного состояния (обливание холодной водой) при хронической сердечной патологии стала тем средством оздоравливающего воздействия, которое было подобрано Сергеем Петровичем для лечения себя самого в последние годы жизни. В этом вопросе, как и во многих других, его научная прозорливость и клинический

талант надолго опередили свое время: формулировка самой теории предвоздействия и последующее фундаментальное изучение феномена начались лишь спустя столетие после Боткина [25].

Литература

1. *Сиротинин В.* С.П. Боткин (1832–1889). В кн. Боткин С.П. Курс клиники внутренних болезней. Изд. III Т. I – СПб, 1912. – С. 3–60.

2. *Тареев Е.М.* Сергей Петрович Боткин и современная клиника // Клин. мед. – 1982. – № 9. – С. 4–11.

3. *Архангельский Г.В., Шульцев Г. П.* Лекарственные прописи С.П. Боткина // Клин. медицина. – 1989. – № 6. – С. 150–152.

4. *Дмитриев И.А.* ОР РНБ: Ф. №1000. – оп. 2. – ед. хр. 423 («Воспоминания»). – 147 с.

5. *Елпатьевский С.Я.* Воспоминания за пятьдесят лет. – Л-д: Прибой, 1929. – 398 с.

6. *Noda, Minatoguchi S., Fujii_K., Hori M. et al.* Evidence for the delayed effect in human ischemic preconditioning: prospective multicenter study for preconditioning in acute myocardial infarction // J. Am. Coll. Cardiol. – 1999 – Vol. 34 (7). – P. 1966–1974.

7. *Ottani F., Galvani M., Ferrini D., Nicolini F.A.* Clinical relevance of prodromal angina before acute myocardial infarction // Int. J. Cardiol. – 1999 – Vol. 68, Suppl 1. – P. 103–108.

8. Yellon D. M., Dana A. The preconditioning phenomenon: A tool for the scientist or a clinical reality? // Circ. Res. – 2000. – Vol. 87 (7) – P. 543–550.

9. Schaller B. Ischemic preconditioning as induction of ischemic tolerance after transient ischemic attacks in human brain: its clinical relevance // Neurosci Lett. – 2005. – Vol. 377 (3). – P. 206–211.

10. *Боткин С.П.* Курс клиники внутренних болезней. Вып. 2 – СПб.: Тип Имп. Академии Наук, 1867–1875. – 177 с.

11. *Боткин С.П.* ОР РНБ: Ф.93. – оп.1. – д.1 (Дневниковые записи 1877–1889 гг.). 315 л.

12. *Надпорожский И.П.* Записки фармакологии – 1889, вып. 3. – 234 с.

13. *Кравков Н.П.* Основы фармакологии. – 1928. – Т. 1, 2.

14. *Вербицкая Т.* Несостоявшийся император. Великий князь Николай Александрович (1843–1865). – М.: Изд. Центрполиграф, 2010. – 350 с.

15. *Пирогов Н.И.* Военно-врачебное дело и частная помощь на театре войны в Болгарии и в тылу действующей армии в 1877–1878 гг., Т. 1. – Санкт-Петербург, 1879. – 405 с.

16. *Толстая А.А.* Записки фрейлины: Печальный эпизод моей жизни при дворе. – М.: «Энциклопедия российских деревень», 1996. – 239 с.

17. *Белоголовый Н.А.* РО РГБ: Ф. 22. – Оп. 1. – Карт. 1–37 (Письма С.П. Боткина к Н.А. Белоголовому).

18. *Соколов Н.И.* История болезни Сергея Петровича Боткина. – СПб, Тип. М.М. Стасюлевича, 1890. – 22 с.

19. *Коган Б.Б.* Чем же болел и отчего умер С.П. Боткин? // Клин. мед. – 1964. – № 2. – С. 149–151.

20. *Кисель А.А.* Памяти Сергея Петровича Боткина // Казанск. мед. журн. – 1930. – № 3. – С. 235–239.

21. *Павлова С.В.* Из воспоминаний (обработка проф. В.С. Галкина) // Новый мир. – 1946. – № 3. – С. 97–144.

22. *Некрасов Н.А.* Полное собрание стихотворений в 3 томах. Советский писатель, 1967. – Т. II. – 699 с.

23. *Белоголовый Н.А.* С.П. Боткин. В кн. Воспоминания и другие статьи. – Москва., 1897. – С. 291–437.

24. *Садовская Н.* М.Е. Салтыков-Щедрин, С.П. Боткин и Н.А. Белоголовый (по материалам архива Н. А. Белоголового) // Записки отдела рукописей Всесоюзной библиотеки им. В.И. Ленина. – 1939. – Вып. 2. – С. 58–66

25. *Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A.* Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium // Circulation. – 1986. – Vol. 74, № 5. – P. 1124–1136.

26. *Салтыков К.М.* Интимный Щедрин. – Москва-Петроград, 1923. – 80 с.

ПРАВИЛА ПОДАЧИ РУКОПИСЕЙ

(составлены с учетом «Единых требований к рукописям, предоставляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов)

«Бюллетень Федерального Центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» представляет на своих страницах оригинальные статьи, обзоры литературы, клинические лекции и наблюдения, учебно-методические публикации. Значительное место будет отведено отечественным и зарубежным публикациям, представляющим новые технологии оказания высоко-технологичной медицинской помощи.

В приложениях к журналу, в соответствии с двусторонними соглашениями между Центром и зарубежными профессиональными медицинскими обществами и ассоциациями, предполагается издавать в русском переводе международные рекомендации по лечению и диагностике в области кардиологии, сердечно-сосудистой хирургии, эндокринологи, гематологии и трансфузиологии.

Издание рассчитано на широкий круг читателей — врачей-специалистов, терапевтов, врачей общей практики, семейных врачей, студентов медицинских ВУЗов, научных работников и преподавателей — и отражает современные взгляды на необходимость развития междисциплинарного подхода к решению проблемы снижения смертности и увеличения продолжительности жизни в РФ.

В журнале имеются следующие разделы: 1) передовые и редакционные статьи; 2) оригинальные статьи; 3) обзоры и лекции; 4) рекомендации для практического врача; 5) дискуссии; 6) краткие сообщения; 7) исторические очерки; 8) информация о планах проведения конференций, симпозиумов, съездов; 9) реклама.

Общими критериями для публикации статей в журнале «Артериальная гипертензия», являются актуальность, новизна материала и его ценность в теоретическом и/или прикладном аспектах. Редакция обеспечивает экспертную оценку (рецензирование) рукописей. На основании двух письменных рецензий и заключения редколлегии рукопись принимается к печати, отклоняется или возвращается автору (авторам) на доработку.

Редакция оставляет за собой право публиковать принятые к печати статьи в том виде и последовательности, которые представляются оптимальным для журнала.

Оформление рукописи. Статьи представляются в редакцию в двух экземплярах, напечатанных на одной стороне белой непрозрачной бумаги формата А4 (210 × 297 мм). Текст должен быть напечатан через 2 интервала, черно-белым шрифтом «Times New Roman» (шрифт 14), с полями: сверху — 20 мм, слева — 30 мм, справа — 10 мм, снизу — 25 мм; а также на электронных носителях или по электронному адресу: bulletin@almazovcentre.ru.

Все страницы должны быть последовательно пронумерованы. Рукопись оригинальных статей (и кратких сообщений) должна включать в себя следующие разделы: 1) титульный лист; 2) резюме; 3) ключевые слова; 4) введение; 5) материалы и методы; 6) результаты; 7) обсуждение; 8) список литературы; 9) иллюстрации; 10) подписи к рисункам; 11) таблицы.

Титульный лист печатается на отдельной странице и включает: ФИО, должность и ученую степень автора (всех соавторов), место (места) выполнения работы и подписи всех авторов (заверяющие согласие на научное и литературное редактирование статьи и передачу редакции журнала прав на статью в отредактированном виде). В нижней части этого листа следует указать ФИО, полный почтовый адрес, телефон, факс и e-mail автора, с которым редакция будет поддерживать контакт. Статья должна сопровождаться официальным направлением от учреждения, в котором выполнена работа, иметь визу научного руководителя. В направлении можно указать, является ли статья диссертационной.

Резюме (Abstract) на русском и английском языках объемом не более 200 слов, включающее ФИО авторов и место выполнения работы, ключевые слова (не более 5). Резюме оригинальной статьи должно включать разделы: актуальность (необязательно) (Background), цель исследования (Objective), материалы и методы (Design and methods), результаты (Results), выводы (Conclusion).

Список литературы составляется в соответствии с ГОСТ РФ 7.0.5-2008 «Библиографическая ссылка» в порядке цитирования, на отдельной странице. Фамилии иностранных авторов в тексте даются в оригинальной транскрипции (в случае, когда число авторов превышает 3, используются формулировки «et al.» и «и соавт.»). Ссылки на литературу, цитируемую в тексте статьи, даются нумерацией арабскими цифрами в квадратных скобках (например, [1]).

Таблицы. Каждая таблица должна быть напечатана на отдельной странице, иметь номер (арабскими цифрами) и название (без сокращений). Таблицы должны располагаться в порядке упоминания в статье (в тексте дается указание, например, табл. 1). Все графы в таблице должны иметь заголовок; все сокращения — расшифрованы в конце таблицы.

Рисунки должны быть выполнены в двух экземплярах на одной стороне отдельных листов плотной белой гладкой бумаги, а также в электронном виде в форматах *.tif, *.pcx, *.bmp (Exel, PowerPoint, Word для графиков и диаграмм). Размер фотографий 9 х 12 см. На обратной стороне каждого рисунка или фото указываются ФИО первого автора, название статьи, номер рисунка и отмечается верх и низ. На рисунке должно быть минимальное количество обозначений, все пояснения выносятся в подпись под рисунком. Для всех иллюстративных материалов в тексте указывается место (в тексте дается указание, например, рис. 1).

Для оригинальной статьи суммарный объем (все разделы) не должен превышать 15 страниц (бумага А4), напечатанных через 2 интервала; для краткого сообщения — 4 страниц; число иллюстраций — не более 3, количество цитированных источников — не более 15. Объем и оформление других видов работ (обзор, лекции или иное) согласуется с редакцией заранее. В материалах, направленных в журнал, должна быть использована система СИ, за исключением размерности величин, традиционно измеряемых в других мерах.

Все аббревиатуры, используемые в статье, должны быть расшифрованы, кроме символов химических элементов и сокращенных названий общеизвестных метрических единиц.

Редакция оставляет за собой право сокращать и исправлять принятые работы.

Направление в редакцию работ, уже переданных в другие издания или напечатанных в них, не допускается. Рукописи, не принятые к печати, авторам не возвращаются. Рукописи, оформленные с нарушением правил, редакцией не рассматриваются.

Тел./факс +7 (812) 702-37-16.

Текущую информацию по журналу можно получить на сайте ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ;

www.almazovcentre.ru

ГЛУБОКОУВАЖАЕМЫЕ
ЧИТАТЕЛИ!

Вы можете оформить подписку на журнал «Бюллетень ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» в агентстве «Роспечать» на первое полугодие 2013 года (1, 2, 3 номера) на персональный адрес или подписаться коллективно (в этом случае журнал будет доставляться вам на работу).

Стоимость подписки на пол года – 500 рублей.

	АБОНЕМЕНТ на журнал					5	7	9	9	2		
						(индекс издания)						
	Бюллетень ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова»					Количество комплектов:						
	на 2013 год по месяцам:											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	X	X	X									
	Куда											
	(почтовый индекс)					(адрес)						
	Кому											
	(фамилия и инициалы)											

				ДОСТАВОЧНАЯ КАРТОЧКА								
				на журнал		5	7	9	9	2		
	ПВ	место	литер	(индекс издания)								
	Бюллетень ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова»											
	Стоимость	подписки	___руб.___коп.	Количество комплектов:	1							
		переадресовки	___руб.___коп.									
	на 2013 год по месяцам:											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	X	X	X									
Куда												
(почтовый индекс)	(адрес)											
Кому												
(фамилия и инициалы)												